

Influencia de la ozonoterapia en el balance oxidativo de équidos

Estudiante:

Fernando Mosquera Jaramillo

121002640

**Proyecto de grado como requisito parcial para obtener el título de Médico
Veterinario Zootecnista**

Línea de Investigación

Salud y Bienestar Animal

Directora

Profa. Dra. Raquel Y. Arantes Baccarin

Codirector

Prof. Dumar A. Jaramillo Hernández

Universidad de los Llanos

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Escuela de Ciencias Animales

Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Villavicencio (Meta)

2017

2. AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Javier y Brenda, que siempre me apoyaron, son mis ejemplos de vida y me proporcionaron lo que fue necesario para que pudiera alcanzar mis objetivos.

A mis hermanos, hermanas, Tía, y Abuelos, Danny, Samuel, Laura, Alejandra, Madelan, Malely, Otilia, Marina y Mario, que fueron una motivación más para la realización de este trabajo.

A mis profesores y amigos Alberto Iregui Iregui, Javier Ricardo Jara Agudelo, Carla B. Belli, Wilson R. Fernandes, Luís Claudio Lopes Correa da Silva, André L.V. de Zoppa, Rodrigo Romero Correa.

A mis dos casas de formación FMVZ-Unillanos y FMVZ-USP, por toda la base, numerosos aprendizajes, profesionales y personales, y buenos momentos vividos al lado de personas muy importantes que conocí durante esta etapa.

A mi directora Raquel Yvonne Arantes Baccarin, que me acogió como orientado estando siempre presente para auxiliarme en el proyecto, en la documentación necesaria y que sin financiamiento hizo que este fuera sacado a delante.

A mi codirector Dumar Alexander Jaramillo Hernández, que me acogió como orientado estando siempre presente para auxiliarme en el proyecto, en la documentación necesaria y despertando mi interés por la investigación, dando una sólida base desde el grupo de investigación ELITE.

A mi primera orientadora Cynthia Do Prado Vendruscolo, que fue mi mano derecha durante todo el proceso de realización del proyecto.

A mis amigos y Hermanos Yenny Paola Ramirez Jara, Carolina Cagua, Nicolas Pereira Garcia, Diego Fernando Munoz Carvajal y Adey Parra Rojas que siempre estuvieron apoyándome durante todo este proceso desde la distancia.

A los residentes del Hovet Marília Bianchini, Sofia Cicolo, Aline de Barros, Carolina Serrano, Maria Eduarda Volpato, Raquel Bellomo, Rafael Dib, Paulo Castro, y Lucas Badini que me auxiliaron en los momentos que necesite, además de la amistad e intercambio de experiencias y buenos momentos.

A los enfermeros Marcos e Cícero por toda la ayuda, compañerismo y amistad durante el ultimo año en la USP.

A los funcionarios Rosendo, Gervásio, Felipe y Ganga por el cuidado y el trato con los animales.

A Nicole, por la ayuda con la citometria de flujo y los análisis.

Al programa de iniciación científica de la universidad de São Paulo bolsa de iniciación científica: pibic-cnpq processo nº 144043/2016-5

A los animales, nuestros queridos árabes, criaturas extraordinarias, que se comportaron muy bien durante las colectas e involuntariamente me auxiliaron en la realización del proyecto.

3.TABLA DE CONTENIDO

2. AGRADECIMIENTOS	2
4. LISTA DE GRAFICOS	6
5. RESUMEN.....	9
6. ABSTRACT	11
7. INTRODUCCIÓN.....	13
8. OBJETIVOS	16
8.1 Objetivo general	16
8.2 Objetivos Específicos	16
9. MARCO TEÓRICO	17
9.1 Ozono (O ₃) como terapéutico	17
9.2 Farmacodinámica implícita en el Ozono.....	18
9.3 Ozonoterapia en veterinaria	19
9.4 Fisiología del balance oxidativo en équidos	20
10. MATERIALES Y MÉTODOS	22
10.1 Ubicación.....	22
10.2 Animales experimentales.....	22
10.3 Diseño experimental	22
10.4 Evaluación clínica.....	23
10.5 Evaluación para clínica: hemograma y análisis bioquímico.....	23

10.6 Cuantificación prostaglandina E ₂ (PG-E ₂).....	24
10.8 Diseño estadístico	26
11. RESULTADOS	27
12 DISCUSIÓN	44
13 CONCLUSIONES	48
14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
15. ANEXOS	56
15.1 certificado comisión de bioética.....	56

4. LISTA DE GRAFICOS

GRAFICO 1- MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA FRECUENCIA CARDIACA (LPM) DE LOS ANIMALES TRATADOS (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.....	27
GRAFICO 2 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA FRECUENCIA RESPIRATORIA (RPM) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	28
GRAFICO 3– MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA TEMPERATURA RECTAL (°C) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	28
GRAFICO 4– MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA MOTILIDAD INTESTINAL DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	28
GRAFICO 5– MEDIAS E DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE ERITROCITOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	29
GRAFICO 6 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE HEMATOCRITO (%) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	30
GRAFICO 7 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA HEMOGLOBINA (G/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	31
GRAFICO 8 – MEDIAS Y DESVIO ESTÁNDAR DEL CHCM (%) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	31
GRAFICO 9 – MEDIAS Y DESVIO ESTÁNDAR DE HCM (%) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y EL GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	32
GRAFICO 10 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE VCM (%) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA	

ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); f DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	33
GRAFICO 11 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LAS PLAQUETAS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$).....	33
GRAFICO 12 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE NEUTRÓFILOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, f DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.....	34
GRAFICO 13 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE EOSINOFILOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	34
GRAFICO 14 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE MONOCITOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	35
GRAFICO 15 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE LINFOCITOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	35
GRAFICO 16 – MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL NÚMERO DE LEUCOCITOS (CEL/ μ L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	36
GRAFICO 17 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE CREATININA (MG/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$). .	37
GRAFICO 18 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE UREA (MG/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); f DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	38
GRAFICO 19 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE BILIRRUBINA DIRECTA (MG/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); f DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.....	38

GRAFICO 20 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE BILIRRUBINA TOTAL (MG/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$).	39
GRAFICO 21 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE AST (U/L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	39
GRAFICO 22 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE GGT (U/L) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	40
GRAFICO 23 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE ALBUMINA (G/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$). .	41
GRAFICO 24 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL (G/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$).	41
GRAFICO 25 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DE LA CONCENTRACIÓN DE FIBRINÓGENO (MG/DL) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO.	42
GRAFICO 26 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR EN LA CUANTIFICACIÓN DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	43
GRAFICO 27 - MEDIAS Y DESVÍO ESTÁNDAR DEL ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO TRATADO (GT) Y GRUPO CONTROL (GC) EN LOS DIFERENTES DÍAS DEL EXPERIMENTO, * DIFERENCIA ESTADÍSTICA EN RELACIÓN A LOS VALORES INICIALES ($P<0,05$); <i>f</i> DIFERENCIA ESTADÍSTICA ENTRE GC Y GT.	43

5. RESUMEN

La ozonoterapia envuelve la aplicación de ozono medicinal (O_3) con un objetivo terapéutico. La ozonoterapia ya es bastante difundida y estudiada en la medicina humana, pero solamente en los últimos años viene siendo utilizada en estudios de medicina veterinaria, demostrando su efecto terapéutico en varias afecciones, por eso estudios científicos que comprueben su seguridad y eficacia en equinos son escasos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de la aplicación de ozono medicinal transrectal en equinos por medio de examen físico, análisis del hemograma, bioquímico, cuantificación de fibrinógeno plasmático, de PGE2 en el plasma, y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) por citometría de flujo. Fueron utilizados doce equinos sanos, machos, de la raza Pura Sangre Árabe con edad media de 36 meses. Los animales fueron tratados por vía rectal, con 1L de la mezcla de oxígeno y ozono en dosis crecientes hasta llegar a 20 $\mu\text{g/ml}$, completando el tratamiento con 10 aplicaciones. Las muestras de sangre venosa fueron recogidas semanalmente en los días 0,7,14,21 y 28, y almacenadas en tubos con anticoagulante y tubos secos. También fue utilizado un grupo control de caballos en paralelo, que no fueron sometidos a ninguna intervención durante ese periodo, para excluir el efecto de ambiente y manipulación. Durante la realización de este estudio en ningún momento del tratamiento los animales demostraron incomodidad o alteración del comportamiento durante la administración de ozono transrectal. Las constantes fisiológicas se mantuvieron dentro de los valores normales a lo largo del tratamiento. En relación a los valores basales, los animales que recibieron O_3 mostraron en la evaluación del hemograma aumento en el número de eritrocitos, en

la concentración de hemoglobina, en los valores de hematocrito y de CHCM ($p<0,05$). En la evaluación del perfil hepático se observó aumento de las concentraciones de bilirrubina directa y total, de proteína total y albumina, pero dentro de los parámetros normales. En relación a la concentración de PGE2 no hubo diferencia entre los momentos evaluados e valores basales, no se observó alteraciones en la producción de EROs durante el experimento. El grupo control no mostro alteraciones significativas en el hemograma, funciones renal y hepática, y en la concentración de PGE2, fue observado mayor producción de EROs en los días 14, 21 y 28 en relación a los valores basales ($p<0,05$). El efecto de ozono en las células rojas, el mejoramiento en las propiedades reológicas de la sangre, más el aumento en la flexibilidad de los eritrocitos, fueron logrados con la aplicación de ozono. Se concluye que la aplicación transrectal de O₃ puede mejorar indirectamente la oxigenación y metabolismo de los tejidos, y modular la producción de EROs, debido al efecto en las células rojas; efectos antiinflamatorios no pudieron ser observados en este modelo.

Palabras claves: ozono, caballos, transrectal.

6. ABSTRACT

Ozone therapy involves the application of medicinal ozone (O₃) for a therapeutic purpose. Ozone therapy is already widespread and studied in human medicine, but only in recent years has been used in veterinary studies, demonstrating its therapeutic effect in several conditions, so scientific studies that prove their safety and efficacy in horses are scarce. The objective of the present work was to evaluate the effects of the application of transrectal medicinal ozone in horses by means of physical examination, blood count, biochemical analysis, quantification of plasma fibrinogen, PGE₂ in plasma and production of reactive oxygen species (EROs) by flow cytometry. Twelve healthy male horses of the Arab Purebred breed were used, with an average age of 36 months. The animals were treated rectally, with 1L of the mixture of oxygen and ozone in increasing doses up to 20 µg / ml, completing the treatment with 10 applications. Venous blood samples were collected weekly on days 0, 7, 14, 21 and 28, and stored in tubes with anticoagulant and dry tubes. We also used a control group of horses in parallel, which were not subjected to any intervention during that period, to exclude the effect of environment and manipulation. During the course of this study at any time during treatment the animals showed discomfort or behavioral disturbance during the administration of transrectal ozone. The physiological constants remained within the normal values throughout the treatment. In relation to the baseline values, the animals receiving O₃ showed an increase in erythrocyte number, hemoglobin concentration, hematocrit values and CHCM values ($p < 0.05$) in the hemogram. In the evaluation of the hepatic profile,

there was an increase in concentrations of total and direct bilirubin, total protein and albumin, but within normal parameters. In relation to the concentration of PGE2 there was no difference between the evaluated moments and basal values, no alterations were observed in the production of EROs during the experiment. The control group did not show significant alterations in the hemogram, renal and hepatic functions, and in the PGE2 concentration, higher EROs production was observed on days 14, 21 and 28 in relation to baseline values ($p < 0.05$). The effect of ozone on red cells, the improvement in rheological properties of blood, plus the increase in red cell flexibility, were achieved with the application of ozone. It is concluded that the transrectal application of O₃ can indirectly improve the oxygenation and metabolism of the tissues, and modulate the production of EROs, due to the effect on the red cells; Anti-inflammatory effects could not be observed in this model.

Keywords: ozone, horses, transrectal.

7. INTRODUCCIÓN

La terapia de ozono implica la aplicación de ozono medicinal (O_3) con objetivo terapéutico, es una mezcla de ozono y oxígeno que reaccionan con diferentes moléculas en el organismo, tales como lípidos, proteínas. especies reactivas de oxígeno y los productos de lipoperoxidación que al contacto con el ozono ejercen una serie de efectos en el organismo como la mejora de la oxigenación y el metabolismo de los tejidos, angiogénesis, el aumento de los mecanismos antioxidantes, mejora del sistema inmune, efecto antiinflamatorio y la modulación de mediadores químicos de dolor. La terapia de ozono ya está muy difundida y estudiada en la medicina humana, pero solamente en los últimos años se han realizados estudios en medicina veterinaria, demostrando su efecto terapéutico en diversas enfermedades. Sin embargo, los estudios que demuestren su seguridad y eficacia en caballos son escasos (A. Schwartz & Sánchez, 2012).

La terapia de ozono ha surgido como opción económica y segura para el tratamiento de diversas enfermedades en seres humanos, y a pesar de ser ampliamente extendido, hay algunas deficiencias en el conocimiento de los métodos ideales de la administración en caballos, así como sus mecanismos de acción (Alves et al., 2004; Ballardini, 2006). Estas deficiencias, unidas a la falta de estudios que verifiquen los múltiples efectos anti-inflamatorios y oxidantes del ozono medicinal en los caballos, motivaron a realizar este trabajo.

Las patologías inflamatorias en équidos son solucionadas en la práctica clínica clásicamente con el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), fármacos que

poseen variados efectos adversos en diversos sistemas orgánicos, siendo conveniente que el veterinario especialista en equinos conozca los riesgos asociados con el uso de estos fármacos con el fin de tomar las medidas profilácticas o terapéuticas apropiadas (Sweeney, Sweeney, & Weiher, 1991), o encontrar alternativas terapéuticas validadas científicamente, como podría ser el uso del ozono medicinal en la especie equina. Se ha demostrado que algunos AINE tienen la capacidad de inhibir la síntesis de adhesinas y la actividad fagocítica de los macrófagos. Al parecer, la flunixinina meglumina tiene menos efectos indeseables al respecto. Así mismo, los polimorfonucleares obtenidos de exudados inflamatorios en reposo o estimulados con zimosan o acetato de forbol-miristato e incubados con diversos AINE, reducen la actividad fagocitaria. La inhibición máxima (para la síntesis de adhesinas y la actividad fagocítica de los macrófagos, respectivamente) fue de 64% y 36% para el ácido acetilsalicílico; 32% y 17% para la fenilbutazona; 15% y 31% para el sulfóxido de dimetilo; 32% y 19% para el ácido salicílico y 0% y 17% para el salicilato de sodio (Keck, 1992).

Los efectos colaterales más comunes de los AINE se asocian con el tubo gastrointestinal (TGI), el sistema hematopoyético y el renal. En raras ocasiones se observa meningitis aséptica, depresión del SNC o hepatotoxicidad. (Higgins, Lees, Taylor, & Ewins, 1986; Lees, Sedgwick, Higgins, Pugh, & Busch, 1991; May, Hooke, & Lees, 1992). Puede haber erosión y ulceración gastroduodenal por inhibición de la prostaglandina I₂ (PG-I₂) y la prostaglandina E₂ (PG-E₂) (que a su vez inhibe la secreción del ácido gástrico) y de otras prostaglandinas responsables de la estimulación de la secreción de moco y bicarbonato que mantienen una barrera entre

el ácido y las células gástricas. La PG-E₂ es un vasodilatador que regula el flujo sanguíneo a la mucosa del tracto gastrointestinal (TGI), la isquemia y la hipoxia generadas por su bloqueo son las condiciones que predisponen a la ulceración y erosión con hemorragias y, en algunos casos, pérdida de proteínas, que conlleva al desarrollo de anemia e hipoproteïnemia. En caballos y potros se ha encontrado ulceración de la mucosa oral por la administración oral de fenilbutazona disuelta en pasta de melaza, lo que indica que un mayor tiempo de contacto con el fármaco incrementa la formación de úlceras en la boca (Murray & Brater, 1993). Diferentes datos emanados de la investigación científica reconocen que el ozono tiene un mecanismo de acción dual: analgésico y antiinflamatorio. Estos efectos parecen ser debidos a su modo de actuar sobre diversos blancos: 1) Una menor producción de mediadores de la inflamación. 2) La oxidación (inactivación) de metabólicos mediadores del dolor. 3) Mejora neta de la microcirculación sanguínea local, con una mejora en la entrega de oxígeno a los tejidos, imprescindible para la regeneración de estructuras anatómicas; la eliminación de toxinas y de manera general a la resolución del disturbio fisiológico que generó el dolor. (Mawsouf, El-sawalhi, Darwish, & Shaheen, 2011; Re, Sánchez, & Mawsouf, 2010)

Por las razones anteriormente expuestas es necesario promover la investigación básica en el campo de consolidación de información científica que valide el uso de terapias alternativas en el campo de la medicina equina, especialmente en los tratamientos antiinflamatorios en équidos; tratamientos que posean mínimos efectos adversos y sustituyan en gran proporción las terapias convencionales y sus efectos deletéreos.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general

Evaluar los efectos en el balance oxidativo de la utilización de ozono medicinal vía transrectal en caballos clínicamente sanos.

8.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el comportamiento clínico y paraclínico de équidos expuestos a ozono medicinal vía transrectal.
2. Establecer las alteraciones del balance oxidativo celular de neutrófilos de sangre venosa central de équidos expuestos a ozono medicinal vía transrectal.
3. Evaluar los efectos del ozono medicinal sobre la PG-E₂ en plasma de équidos expuestos a ozono medicinal vía transrectal.

9. MARCO TEÓRICO

9.1 Ozono (O₃) como terapéutico

El ozono es el gas más importante en la estratosfera, alcanzando su concentración máxima (por encima de 1000 g/m³) a una altura de 20 a 30 km. Este tiene una naturaleza inestable, tiene una alta velocidad de descomposición varía en el orden de 10⁵ a 10⁶ mol / s por estas características no puede ser recogido ni almacenado y debe ser usado inmediatamente, O₃ es la forma alotrópica de oxígeno que tiene en su composición tres átomos de oxígeno, puede ser producido por tres fuentes principales de energía: química / electrólisis, descargas eléctricas y la radiación UV. El ozono es 1,6 veces más denso y 10 veces más soluble en agua (49,0 mL en 100 mL de agua a 0 °C), siendo el tercer oxidante más potente después de flúor y persulfato (Schwartz & Sánchez, 2012).

La investigación de las propiedades del ozono en el siglo XIX demostró que es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos, por oxidación completa, es decir, hasta la formación de agua, óxidos de carbono y óxidos superiores. En cuanto a su reactividad frente a sustancias biológicas, influye selectivamente en las que tienen enlaces dobles y triples. Entre estas están proteínas, aminoácidos y ácidos grasos insaturados, que forman parte de la composición de los complejos de lipoproteínas en el plasma y de las bicapas de las membranas celulares (A. F. Schwartz & Sánchez, 2012).

Cuando el ozono entra en contacto con los fluidos biológicos (sangre, plasma, linfa, solución salina, orina, etc.) se disuelve en el agua presente en estos fluidos y reacciona en segundos. Antioxidantes lipófilicos e hidrófilicos presentes en estos fluidos corporales producen una cantidad mínima de ozono, pero si la concentración aplicada es correcta, existe la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) adecuadas y productos de peroxidación (LOPS). La formación EROS en el plasma

es extremadamente rápido (menos de un minuto) y se acompaña de una transitoria y pequeña capacidad antioxidante ozono dependiente (que va desde 5% a 25%). Esta capacidad antioxidante se recupera dentro de 15-20 minutos. Sin embargo, el peróxido de hidrógeno y otros mediadores que se han difundido en las células, por activación de diferentes vías metabólicas en eritrocitos, leucocitos y plaquetas, dando lugar a numerosos efectos biológicos (Gracer & Bocci, 2005).

9.2 Farmacodinámica implícita en el Ozono

Los diferentes datos de la investigación científica reconocen que el ozono tiene un doble mecanismo de acción: analgésica y antiinflamatoria estos efectos parecen ser debido a la forma en que actúa sobre los diferentes objetivos: 1) una menor producción de mediadores inflamatorios 2) Oxidación (inactivación) de los metabólicos mediadores del dolor. 3) mejora de la microcirculación local, es decir, la mejora en el suministro de oxígeno a los tejidos es esencial para la regeneración de las estructuras anatómicas y la eliminación de toxinas y por lo general la resolución de la condición que causó dolor (Mawsouf et al., 2011; Re et al., 2010).

La terapia de ozono se puede administrar por diversas vías tales como autohemoterapia, intravenosa (IV) agua o soluciones fisiológicas ozonizados, inflaciones rectal o vaginal, intraarticular, prolo / escleroterapia, aceite de oliva ozonizaron inhalación tópica u oral directa, auricular, intraperitoneal, subcutánea, entre otros (V. A. Bocci, 2006; Jani, Patel, Yadav, Sant, & Jain, 2012).

9.3 Ozonoterapia en veterinaria

A pesar de que existen muchos estudios con ozono medicinal en la medicina humana así como en animales de experimentación, en la medicina veterinaria es todavía muy poco estudiada. La literatura reporta sólo unos pocos estudios con caballos (Alves et al., 2004; Ballardini, 2005, 2006; Garcia Liñeiro, Teresa, Hugo, & Eugenia, 2009) y ganado (Ogata & Nagahata, 2000; Zobel, Tkalčić, Štoković, Pipal, & Buić, 2012). En el tratamiento del dolor toraco-lumbar, Liñeiro García et al. (2009) Describieron una serie de 15 casos de dolor toraco-lumbar tratados con cuatro aplicaciones semanales en la periferia de la lesión, dando como resultado la ausencia de dolor a la palpación en el 100% de los casos, la mejora o la resolución de la cojera en el 100% de los casos y en el 88% de los casos hubo una mejora en el rendimiento deportivo. Ya Ballardini (2005) trató cuatro caballos de trote con aplicaciones subcutáneas de ozono en la concentración de 75 mg / ml a la semana durante tres a cuatro semanas. Al final del tratamiento los animales ya no tenían el paso torpe y ni dolor a la palpación, obteniendo un mejor rendimiento atlético de los animales.

Alves et al. (2004) probaron el efecto de la solución salina ozonizada después de la isquemia y reperfusión experimental observaron un menor desprendimiento epitelial de la mucosa ,infiltración de neutrófilos, hemorragia y edema. De esta forma se probó el mayor efecto de la auto-hemoterapia en caballos, Ballardini (2006) observó una mejora en el rendimiento deportivo en animales sanos, normalización de cuadros de trombocitopenia, anemia y leucocitosis, después del tratamiento con 500 ml de sangre.

En el tratamiento de mastitis en vacas se obtuvo la resolución en el 60% de los casos, con una mejoría clínica de los animales y los análisis de la leche, apareciendo como una alternativa viable y de bajo - costo (Ogata; Nagahata, 2000). En los casos de urovagina hubo una disminución en el número de inseminaciones artificiales y menores vacas de descarte en el grupo tratado con solución salina ozonizada. Este efecto probablemente ocurrió debido al efecto bactericida y anti-inflamatorio del ozono que mejora el medio ambiente para la fertilización y fue superior a la solución con antibiótico utilizada que sólo redujo la carga bacteriana (ZOBEL et al., 2012).

9.4 Fisiología del balance oxidativo en équidos

La capacidad antioxidante celular está representada por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos: Mecanismos enzimáticos. Las enzimas antioxidantes de mayor importancia son la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GPX). Mecanismos no enzimáticos. El Glutatión (GSH) y la vitamina E son los principales compuestos endógenos antioxidantes. Estos compuestos a diferencia de las enzimas, se consumen durante su acción antioxidante, por lo que deben ser regenerados después de ser oxidados. En relación a las enzimas antioxidantes, la familia de las SOD está constituida por metaloenzimas que convierten el O_2 en H_2O_2 ; las CAT transforman el H_2O_2 en agua y oxígeno molecular; y la GPX reduce hidroperóxidos a alcoholes y utiliza el GSH como agente reductor transformándolo en glutatión oxidado (GSSG). Cabe señalar que el GSSG es reducido nuevamente mediante la GSH-reductasa (GR) (Afonso, Champy,

Mitrovic, Collin, & Lomri, 2007; Campo et al., 2003; Kirschvink, Moffarts, & Lekeux, 2008; Lykkesfeldt & Svendsen, 2007; Sorg, 2004) Existe creciente bibliografía que señala a la GSH-transferasa (GSht) como enzima reguladora de estrés oxidativo. Se describen isoformas de esta enzima, citosólica y ligadas a membrana. Todas están involucradas en la detoxificación de carcinógenos, contaminantes ambientales, agentes antitumorales e hidroperóxidos formados como metabolitos secundarios del estrés oxidativo que tienen como característica común, su alta electrofilicidad (Hayes, Flanagan, & Jowsey, 2005).

Estas proteínas catalizan además una variedad de reacciones de conjugación de compuestos electrofílicos y lipofílicos con glutatión (GSH). Más aún, las GSht son capaces de unir reversiblemente una serie de compuestos lipofílicos y actuar como transportadores intracelulares, similar al rol que cumple la albúmina en la sangre; los compuestos que participan en esta unión reciben el nombre de ligandos. También estas proteínas unen covalentemente un amplio espectro de compuestos electrofílicos y lipofílicos en forma irreversible; posteriormente la proteína unida al electrófilo es degradada (Ketterer, 1970). Se ha demostrado científicamente, que las aplicaciones controladas del ozono médico mejoran la maquinaria antioxidante celular al haberse medido en el interior de las células cantidades superiores de agentes antioxidantes, tales como el glutatión reducido o la superóxido dismutasa. Como consecuencia directa el ozono actúa como un verdadero “basurero celular”, limpiando los radicales libres. De acuerdo con este concepto, la ozonoterapia tendría un efecto anti-envejecimiento celular. Conscientes de que es necesaria una mayor cantidad de publicaciones e investigaciones (H. H. Ajamieh et al., 2005).

10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Ubicación

Este trabajo fue realizado en el hospital veterinario de la Universidad de Sao Paulo ubicado en la Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Ciudad Universitaria “Armando de Salles Oliveira” Butanta Sao paulo – Brasil CEP. 05508-270; a una altura de 740 msnm, precipitación de 1340 mm/año, humedad relativa de 86% y temperatura promedio de 18.5°C.

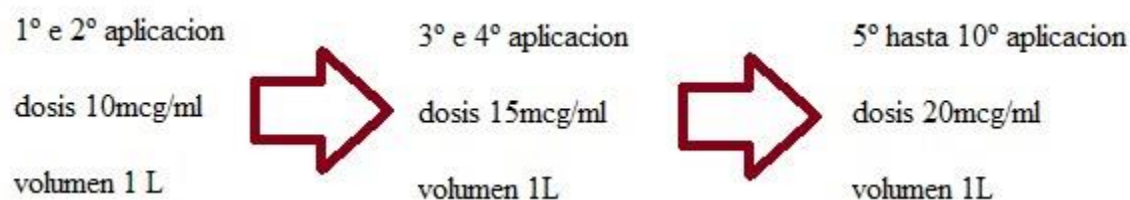
10.2 Animales experimentales

Se utilizaron doce (12) caballos sanos, machos, raza pura árabe, con una edad media de 36 meses. Los animales se alojaron en las pesebreras del Departamento de Medicina Clínica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo. Después del período de adaptación, fueron desparasitados, recibieron 1 Kg de concentrado comercial dos veces al día, heno y agua *ad libitum*.

10.3 Diseño experimental

Los animales recibieron vía rectal, después de vaciado manual del recto, 1 L de la mezcla de oxígeno y ozono en dosis crecientes hasta 20 µg/mL, con una dosis inicial de 10 µg/ mL por dos aplicaciones, 15 µg/mL por dos aplicaciones y 20 µg/mL por 5 aplicaciones, que completando el tratamiento con 10 aplicaciones (ver figura 1). Fueron hechas 3 veces a la semana durante 4 semanas.

Figura 1. Descripción de la dosificación de ozono vía transrectal en équidos



10.4 Evaluación clínica

La evaluación física consistió en medir la frecuencia cardíaca, respiratoria y descargas del ciego a través de la auscultación, cardíaca, pulmonar y descarga de la válvula ileocecal, respectivamente, medición de la temperatura rectal, inspección de las membranas mucosas y tiempo de llenado capilar (TPC). La evaluación física fue desde el tiempo 0 (control) para la selección de los animales y diariamente hasta el final del experimento.

10.5 Evaluación para clínica: hemograma y análisis bioquímico

Las muestras de sangre venosa (3 mL) fueron tomadas de la vena yugular izquierda, utilizando el sistema de recogida de vacío (Vacutainer BD[®]) y las agujas de 40x9mm, y fueron almacenadas en tubos de vidrio siliconados con tapa de goma que contiene 50 µL K₃EDTA como anticoagulante en tubo seco, fueron empacadas con hielo para su posterior procesamiento en el laboratorio del Departamento de clínica, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - USP. El recuento total de células rojas de la sangre y las células blancas de la sangre, hemoglobina, la determinación de

índices de volumen celular y de eritrocitos, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), y los recuentos diferenciales de leucocitos se llevaron a cabo con la ayuda de analizador automático de hematología de Siemens (ADVIA 2120 modelo). La función renal (urea y creatinina) y hepática (proteínas totales, albúmina, AST, GGT, bilirrubina directa e indirecta) se llevó a cabo con la ayuda de analizador bioquímico automático marca Labtest (LabMax 240 modelo). El fibrinógeno plasmático se evaluó de acuerdo con la técnica descrita por Foster et al. (1959) y adaptado para JAN (1986), que se basa en la desnaturalización de las proteínas a 56 ° C, con lectura en refractómetro.

10.6 Cuantificación prostaglandina E₂ (PG-E₂)

La cuantificación de PGE₂ fue realizada por ELISA, con el kit Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal de la empresa Cayman Chemical Company (EUA). El plasma utilizado estaba acondicionado en tubos eppendorf sin anticoagulante, mantenidos a temperatura de 80°C. EIA Buffer fue adicionado a los pozos de ligación inespecífica (100µl) y a los pozos de máxima ligación (50µl). La curva patrón fue hecha duplicada, adicionando 50µl en cada pozo. Después, 50µl de las muestras de plasma fueron adicionadas dos veces, con excepción de los pozos de actividad total y blanco. La placa fue encubada por 18 horas a 4°C y después lavada cinco veces con Wash Buffer. Fueron adicionados 200µl de Ellman's Reagent, preparado inmediatamente antes de su utilización, en todos los pozos, y solo el pozo de actividad total recibió 5µl de Tracer. La placa fue protegida de la luz y medida en el agitador por 60 a 90

minutos. La absorbancia de la muestra fue leída a 405nm en el lector de ELISA y correlacionada la concentración por el uso de una curva patrón con variación de 7.8 a 1000pg/ml por el programa Gen5. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Clínica Médica FMVZ / USP.

10.7 Evaluación del estrés oxidativo (estallido respiratorio de neutrófilos)

Después de la colecta de la sangre en tubos con heparina sódica, las muestras fueron divididas en alícuotas para análisis subsecuentes. Cada muestra fue dividida en tres tubos de ensayo de 12x75mm, en poliestireno cristal transparente: blanco, burst basal y phorbolmiristato acetato (PMA). Para el burst oxidativo fueron necesarios 25µl de la muestra en cada tubo de ensayo. Solo en los tubos de ensayo referentes a el burst basal y PMA fueron adicionados 200µl del reagente dicloro-diidro-fluoresceína-acetato (DCFH), la concentración final de 55µM, que fluoresce en verde con la presencia de EROs y cuando es exitado en 488nm. En los tubos denominados PMA fueron adicionados 100µl del reagente PMA, en la concentración final de 90,9 ng/ml o aproximadamente 150 nM el cual actúa como estímulo químico para o burst oxidativo, actuando vía proteína kinasa C (PKC) y fosfolipasa D (PLD) en neutrófilos. En todos los tubos fue adicionada solución salina tapada con fosfato (PBS) suficiente para completar el volumen final de reacción de 1,1ml. Los tubos fueron encubados a 37°C por 20 minutos. Después de la encubación las muestras tuvieron las hemacias lisas con auxilio de 2ml de tapón de lisis Amonio-Cloreto-potasio (ACK), permaneciendo en reposo durante 5 minutos, y finalmente, centrifugadas a 400G por 7 minutos en temperatura ambiente. El sobrenadante fue

descartado y el pellet de células fue re suspendido en 200µl de PBS para el análisis por citometria de flujo. Las muestras fueron verificadas por medio de citometro de flujo¹, por medio del software de adquisición². Las poblaciones de células fueron definidas en gráficos de tamaño por complejidad (FSCxSSC) en escala lineal. La población de mayor tamaño y complejidad fue caracterizada como los neutrófilos y fue utilizada para definir parámetros de adquisición y posterior análisis. Tubos blancos fueron usados para determinar ausencia de fluorescencia en cuanto a los tubos de burst basal fueron aplicados para definir positividad de fluorescencia verde no detector FL1, sin ultrapasar

los limites posibles. Fueron salvados 7000 eventos de la población de neutrófilos para cada archivo (animal/tiempo). Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo³. Fue solicitado a el programa el cálculo de media geométrica de fluorescencia (geomean) en el canal FL1 y los valores fueron extraídos en planillas de Microsoft Excel.

10.8 Diseño estadístico

Los resultados son presentados en medias y desviación estándar, a los cuales se les aplico prueba de homogeneidad de varianza, Bartlett, y posteriormente fueron tratados con ANOVA de una vía y posthoc Tukey-Kramer. La significación estadística fue de $p < 0,05$. Para estas actividades se utilizó el programa estadístico OpenStat 4. Versión 9.0.

¹ FACSCalibur (BD Bioscience)

² Cell Quest (BD Bioscience)

³ FlowJo versão 7.6.4 para Windows (Treestar, Inc.)

11. RESULTADOS

11.1 examen físico

La frecuencia cardiaca, respiratoria, temperatura y motilidad intestinal no se alteraron significativamente entre los grupos (GT y GC) o entre los momentos dentro de los grupos ($p>0,05$) (Gráficos 1,2,3 y 4).

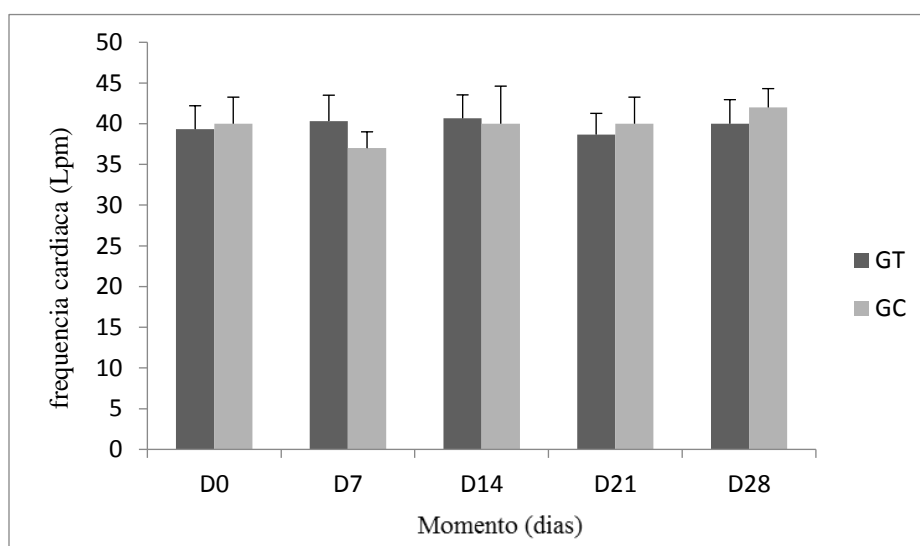


Gráfico 1- medias y desvío estándar de la frecuencia cardiaca (lpm) de los animales tratados (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

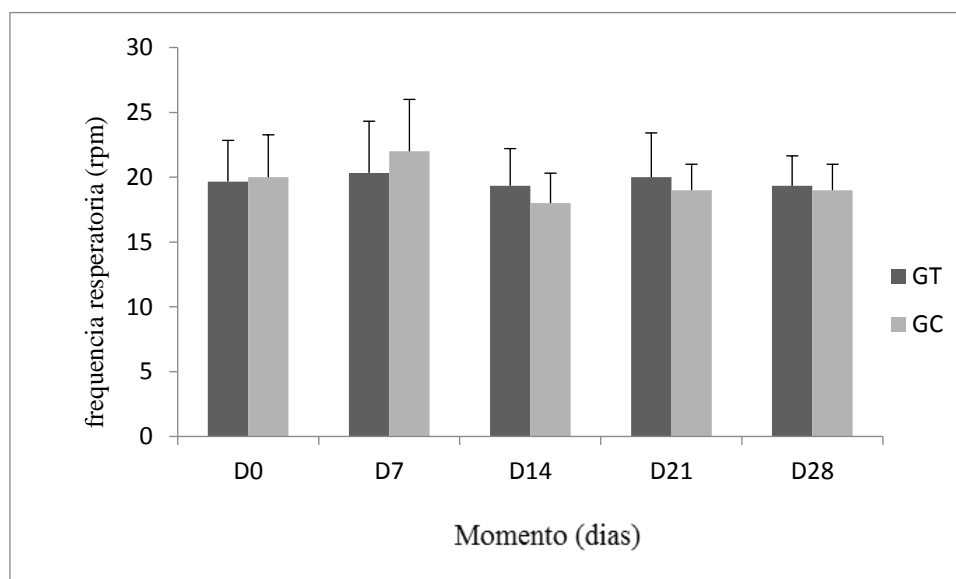


Grafico 2 – Medias y desvío estándar de la frecuencia respiratoria (rpm) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

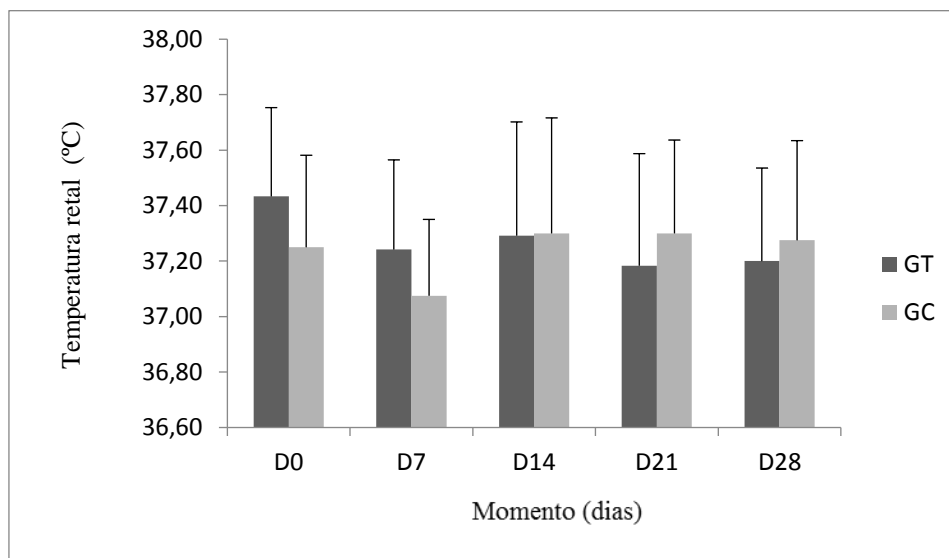


Grafico 3– medias y desvío estándar de la temperatura rectal (°C) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

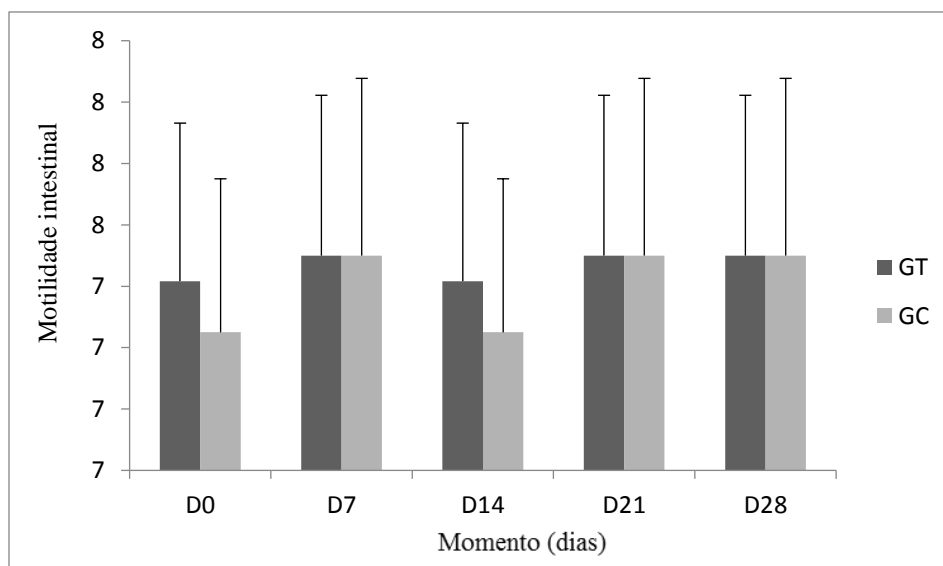


Grafico 4– Medias y desvío estándar de la motilidad intestinal de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

11.2 HEMOGRAMA

El número de eritrocitos aumento significativamente en el grupo GT en relación a los valores iniciales en todos los momentos y en relación a el GC en los momentos D14 y D21 ($p < 0,05$) (Grafico 5).

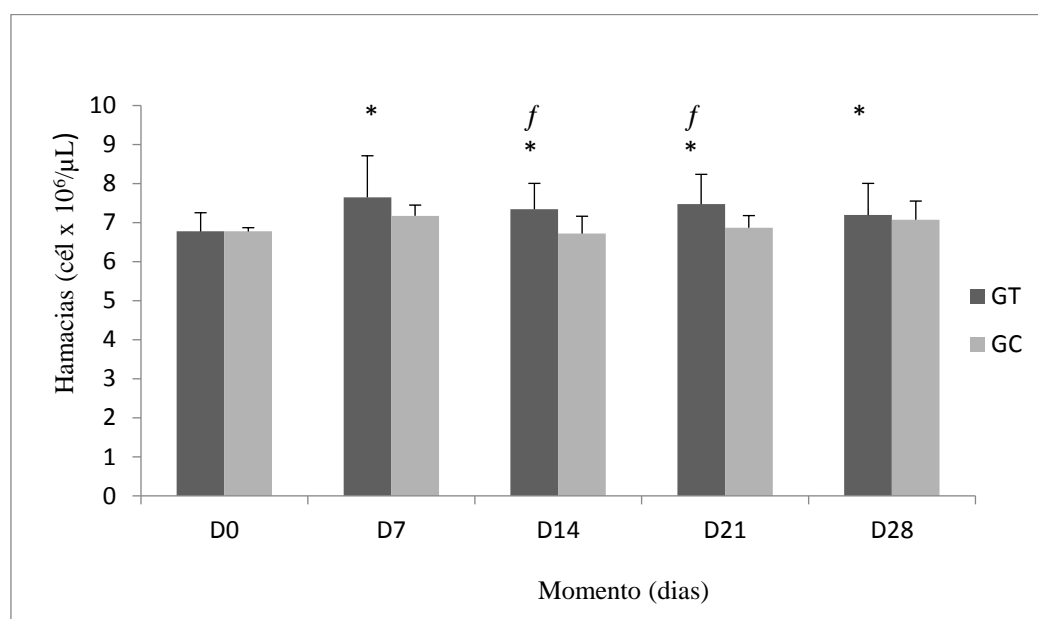


Grafico 5– Medias e desvío estándar del número de eritrocitos ($\text{cel}/\mu\text{L}$) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

El hematocrito aumento en el GT en relación a los valores iniciales de D7 hasta D21 ($p < 0,05$). En el GC hubo aumento en relación a los valores iniciales en el D14 ($p < 0,05$). Se observó en el GT aumento en relación a el GC en los momentos D7 a D21 ($p < 0,05$) (Grafico 6).

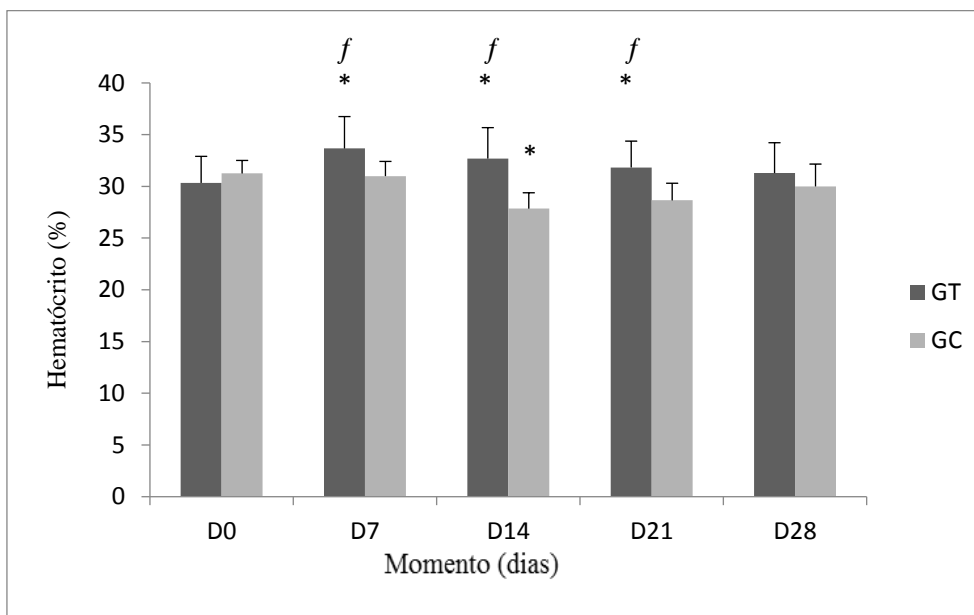


Grafico 6 – Medias y desvío estándar de hematocrito (%) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

Las concentraciones de hemoglobina aumentaron en el GT en relación a los valores iniciales del D7 ($p < 0,05$). En el GC hubo aumento en relación a los valores iniciales en el D7 ($p < 0,05$). Se observó en el GT aumento en relación a el GC en el momento D14 ($p < 0,05$) (Grafico 7).

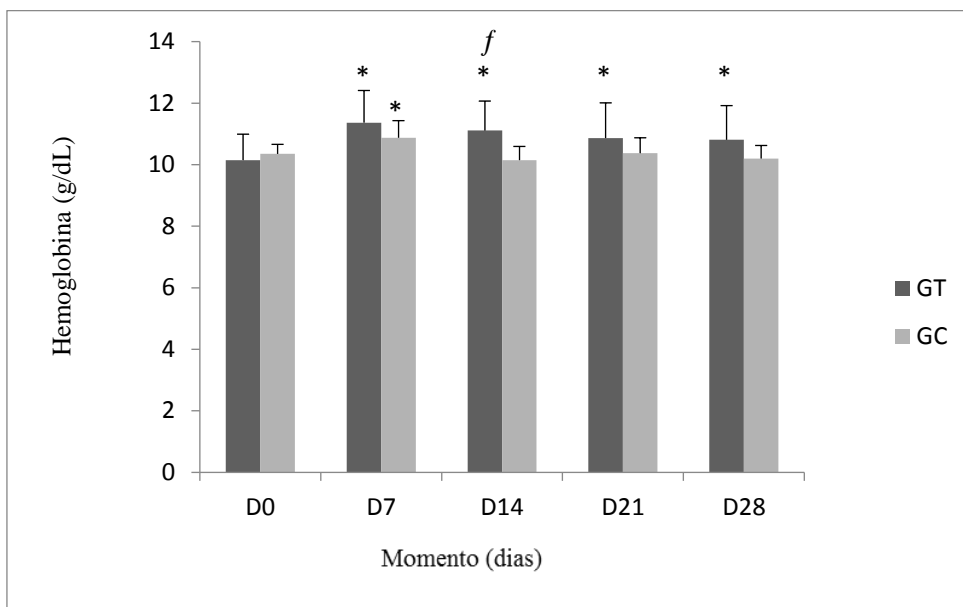


Grafico 7 – Medias y desvío estándar de la hemoglobina (g/ μ L) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

El CHCM aumentó significativamente en el GT con relación a los valores iniciales a partir del D14 y en relación a el GC en los momentos D7 hasta D21 ($p < 0,05$) (Grafico 8).

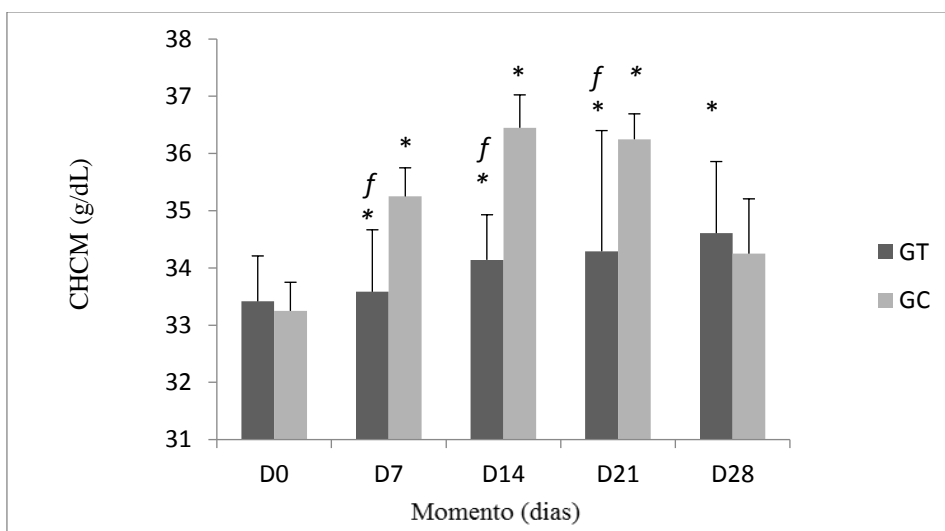


Grafico 8 – Medias y desvío estándar del CHCM (%) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia

estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

El HCM no vario significativamente entro los grupos ni entre los momentos del mismo grupo ($p > 0,05$) (Grafico 9).

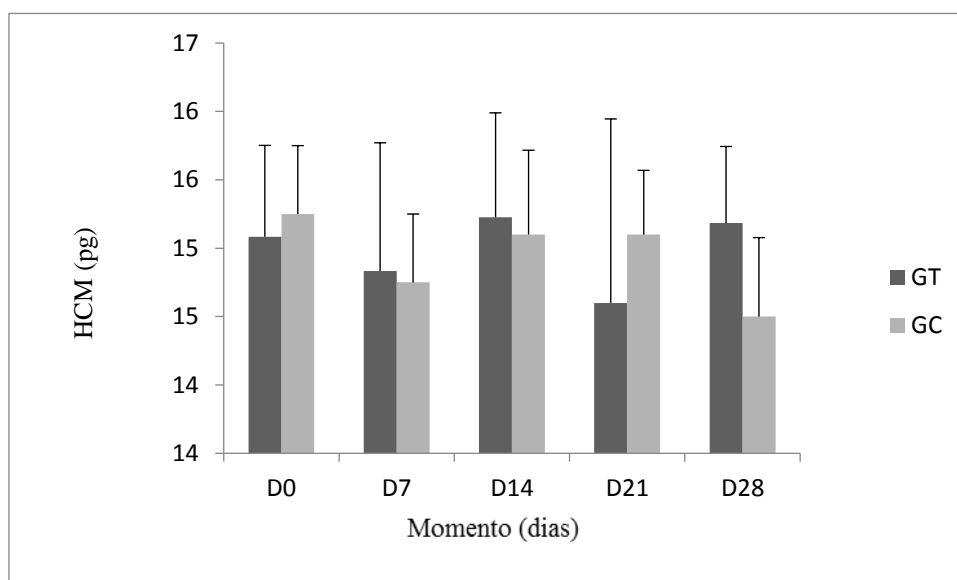


Grafico 9 – Medias y desvio estándar de HCM (%) de los animales del grupo tratado (GT) y el grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

El VCM disminuyo en el GT en relación a los valores iniciales a partir de D21 ($p < 0,05$). En el GC hubo disminución significativa en relación a los valores iniciales a partir de D7. Se observó en GT aumento en relación a el GC en D7 y D14 ($p < 0,05$) (Grafico 10).

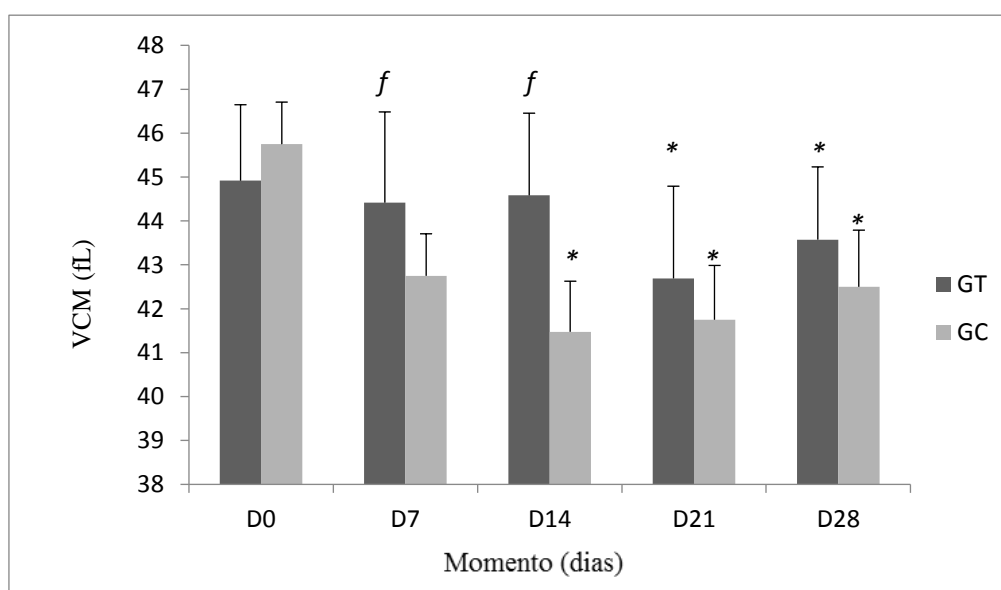


Grafico 10 – Medias y desvío estándar de VCM (%) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

Las plaquetas aumentaron en el GT en relación a los valores iniciales en D21 ($p < 0,05$). No se observó diferencia estadísticamente significativa entre GT y GC ($p > 0,05$) (Grafico11).

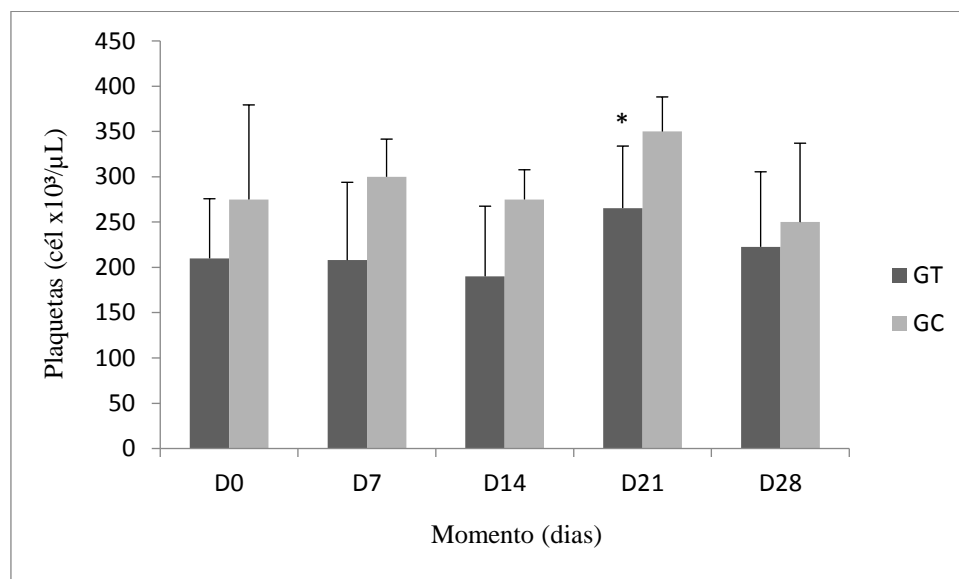


Grafico 11 – Medias y desvío estándar de las plaquetas (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$).

El número de neutrófilos disminuyó en el GT en relación a el GC en el D14 ($p < 0,05$). No hubo diferencia significativa en el número de eosinófilos, monocitos, linfocitos y leucocitos totales entre los grupos o entre los momentos dentro del mismo grupo ($p > 0,05$) (Gráficos 12,13,14,15 y 16).

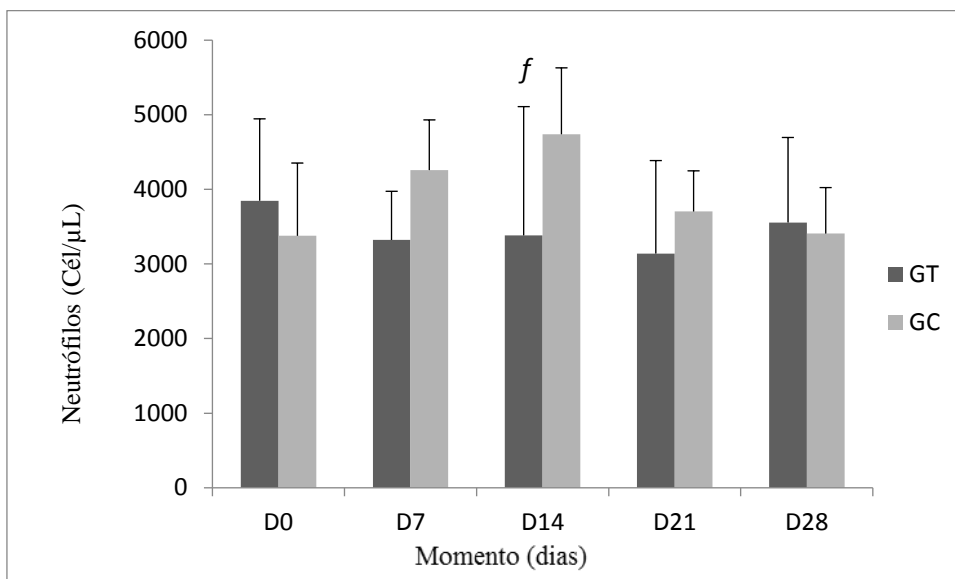


Grafico 12– Medias y desvío estándar del número de neutrófilos (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, ^f Diferencia estadística entre GC y GT.

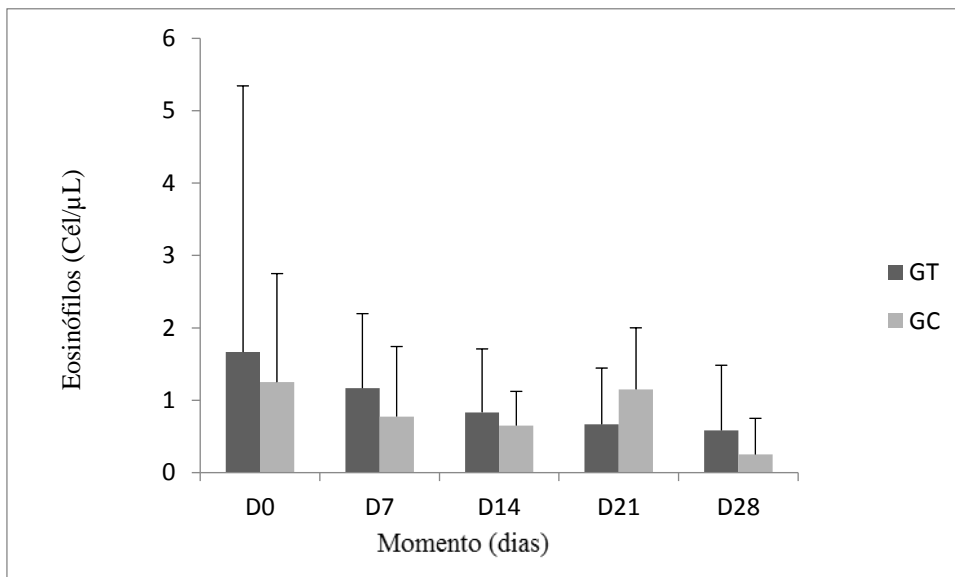


Grafico 13 – Medias y desvío estándar del número de eosinofilos (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

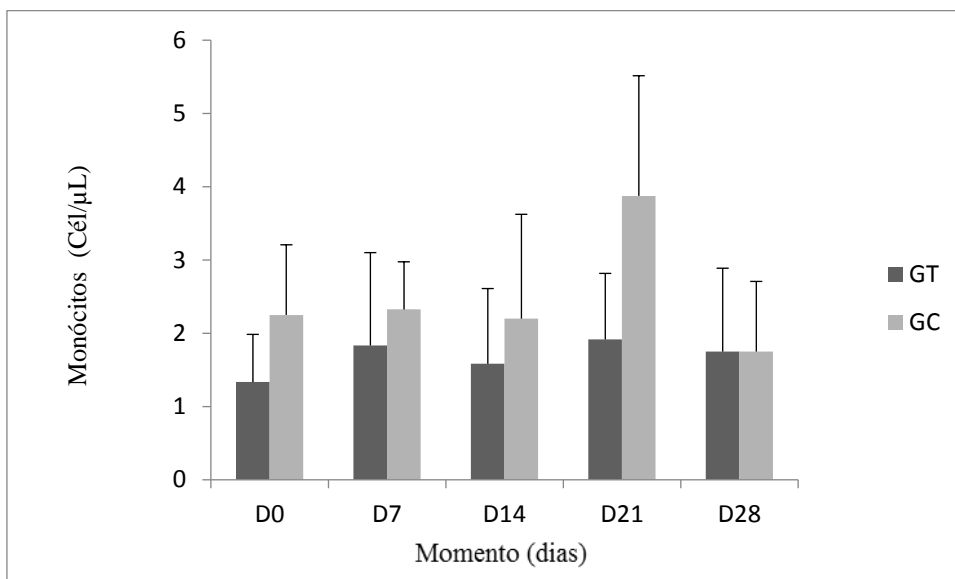


Grafico 14– Medias y desvío estándar del número de monocitos (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

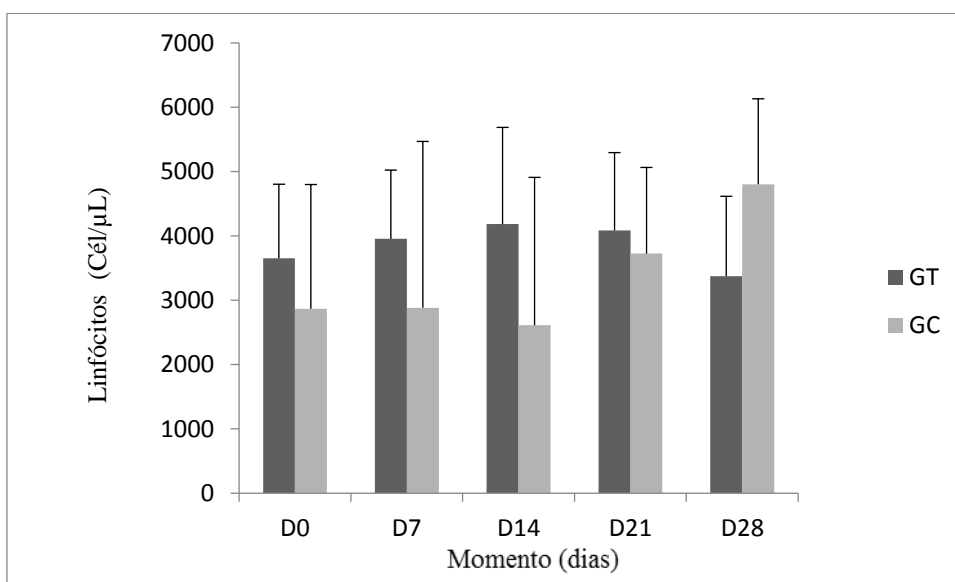


Grafico 15 – Medias y desvío estándar del número de linfocitos (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

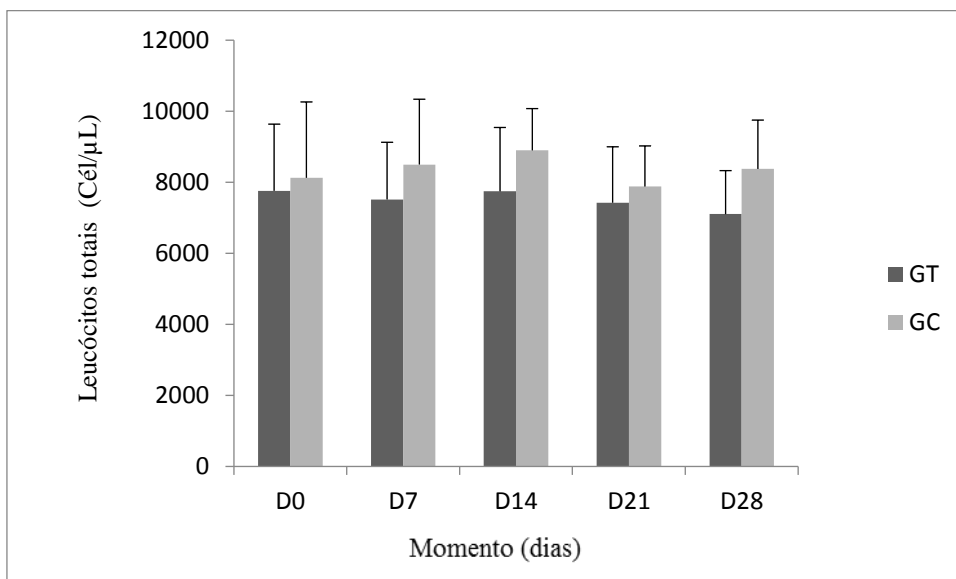


Grafico 16 – Medias y desvío estándar del número de leucocitos (cel/μL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

11.3 BIOQUÍMICO.

Hubo un aumento en la concentración de creatinina en el GT en relación a los valores iniciales en el D21 ($p < 0,05$). No hubo aumento significativo en el GC ni entre los grupos GT y GC ($p > 0,05$) (Grafico 17).

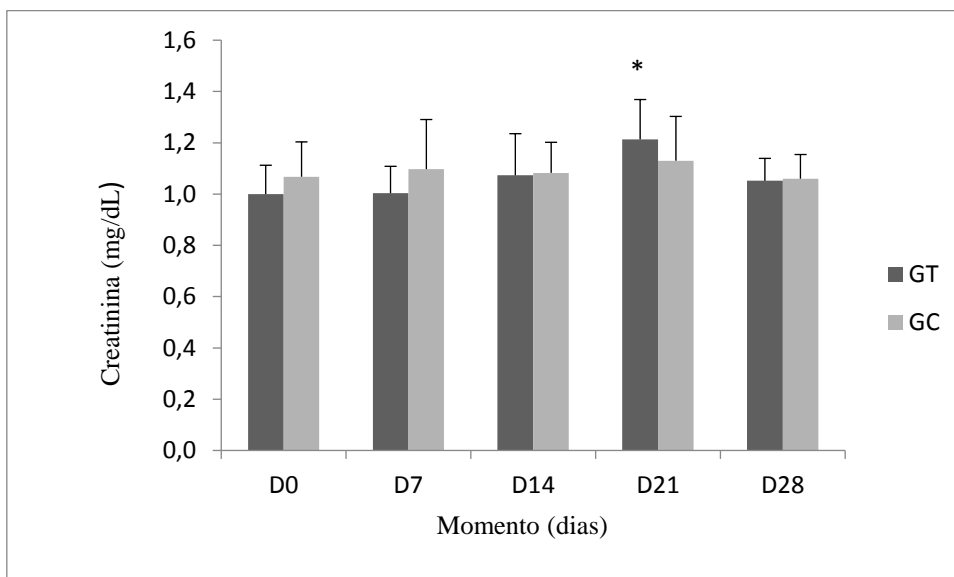


Grafico 17- Medias y desvío estándar de la concentración de creatinina (Mg/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$).

Se observó aumento en la concentración de urea en el GC en relación a los valores iniciales en los D7 y D21 ($p < 0,05$). No hubo diferencia significativa entre los momentos del GT ($p > 0,05$). Se observó en el GT disminución en relación al GC en el D28 ($p < 0,05$) (Grafico 18).

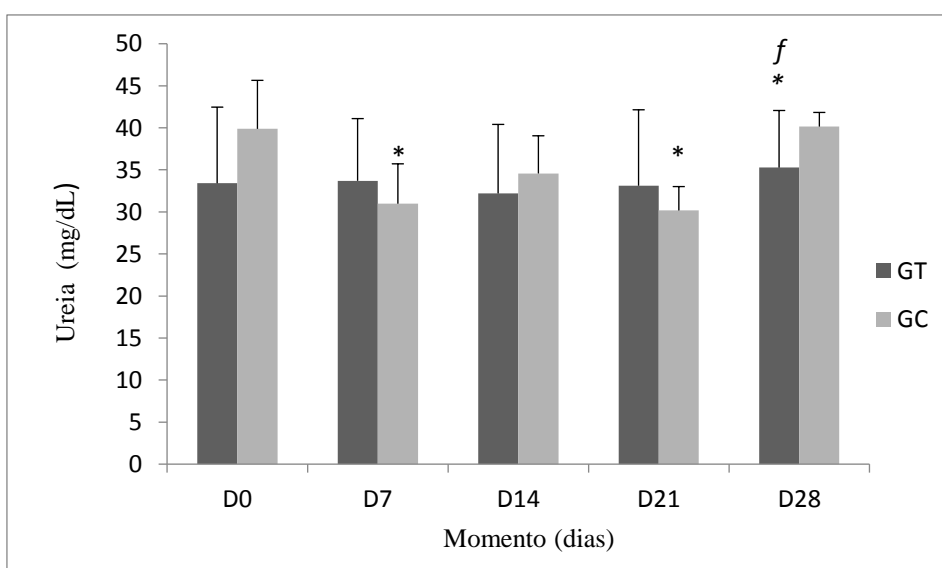


Grafico 18 - Medias y desvío estándar de la concentración de urea (Mg/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

La concentración de bilirrubina directa aumento en el GT en relación a los valores iniciales en el D28($p < 0,05$), y en relación al GC en el momento D28 ($p < 0,05$). No hubo diferencia entre los momentos en el GC ($p > 0,05$) (Grafico 19).

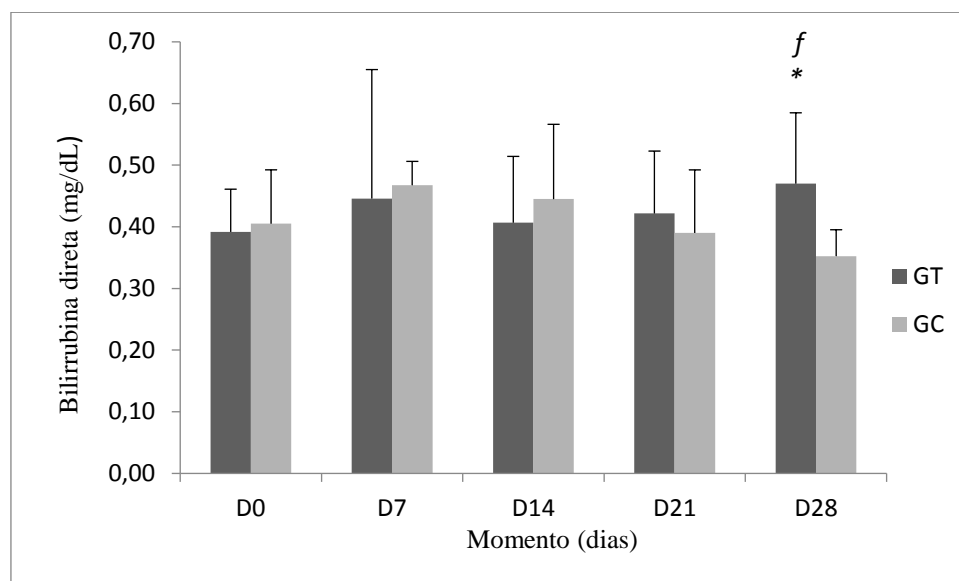


Grafico 19 - Medias y desvío estándar de la concentración de bilirrubina directa (Mg/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

Hubo aumento en la concentración de bilirrubina total en el GT en relación a los valores iniciales a partir del D14 ($p < 0,05$). En el GC hubo aumento en relación a los valores iniciales en los D14 y D21($p < 0,05$). No hubo diferencia entre GT y GC ($p > 0,05$) (Grafico 20).

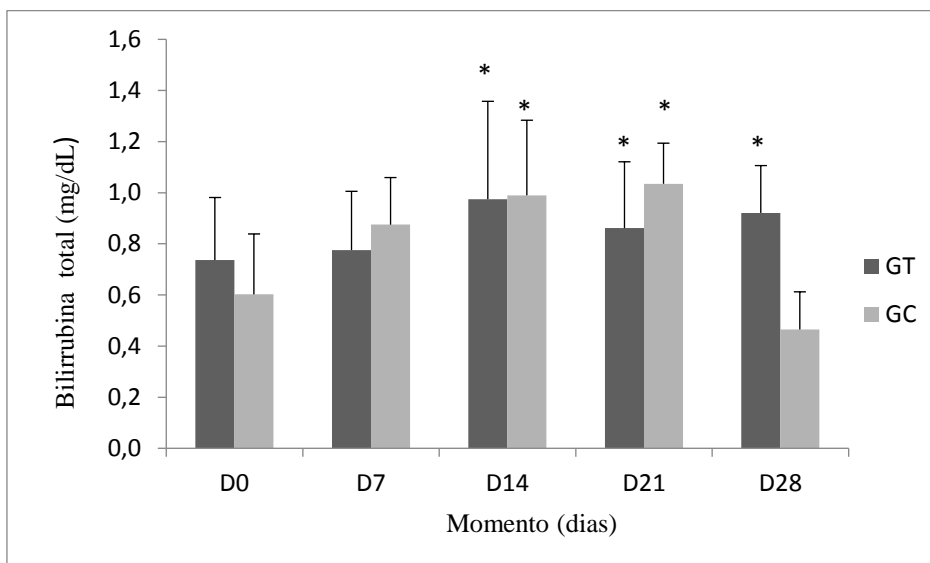


Grafico 20 - Medias y desvío estándar de la concentración de bilirrubina total (Mg/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$).

Las concentraciones de AST y GGT no mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) (Gráficos 21 y 22).

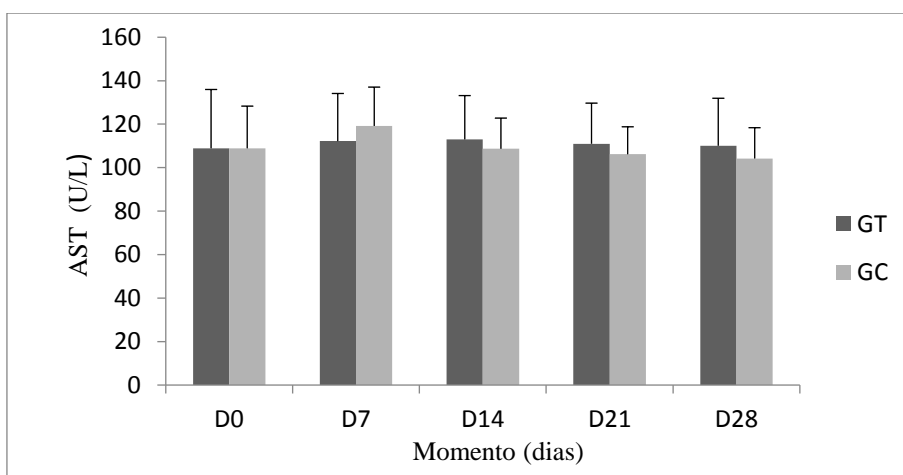


Grafico 21 - Medias y desvío estándar de la concentración de AST (U/L) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

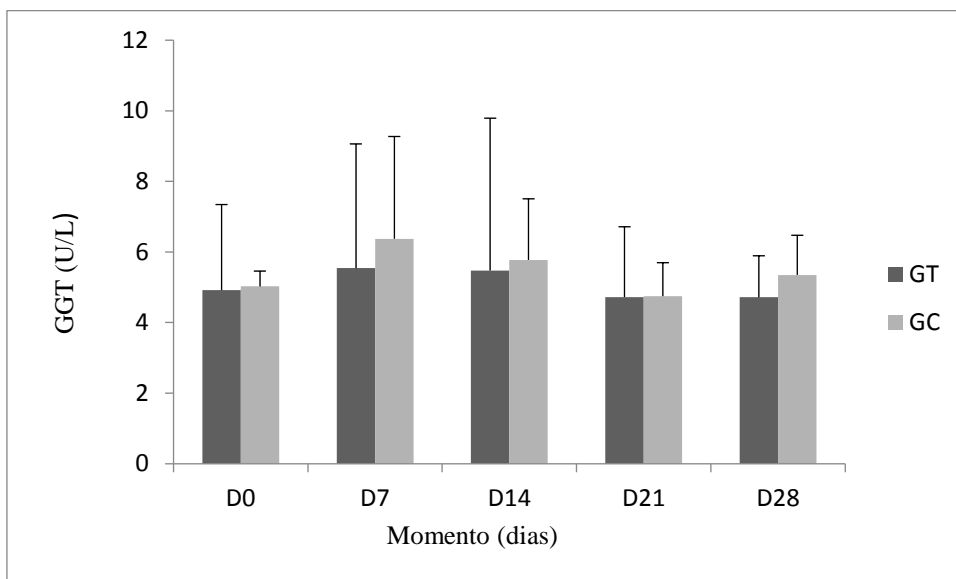


Grafico 22- Medias y desvío estándar de la concentración de GGT (U/L) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

La concentración de albumina aumento en el GT en relación a los valores iniciales de D7 a D21 ($p < 0,05$). En el GC hubo aumento en relación a los valores iniciales de D7 e D14 ($p < 0,05$). No se observó diferencia entre GT y GC ($p > 0,05$) (Grafico 23).

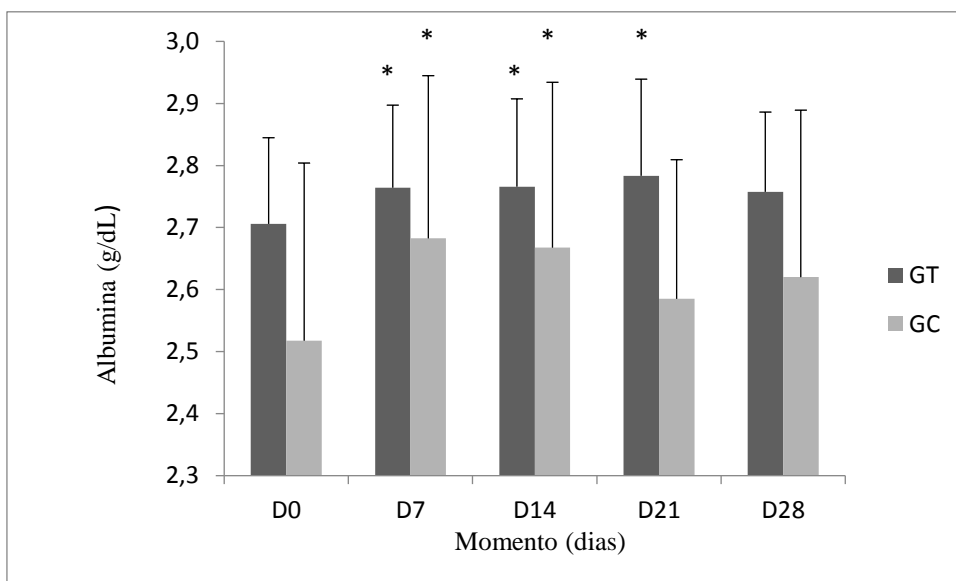


Grafico 23 - Medias y desvío estándar de la concentración de albumina (g/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$).

La concentración de proteína total aumento en el GT en ralacion a los valores iniciales de D7 a D21 ($p < 0,05$). No se observó diferencia entre los momentos de GC ni entre GT y GC ($p > 0,05$) (Grafico 24).

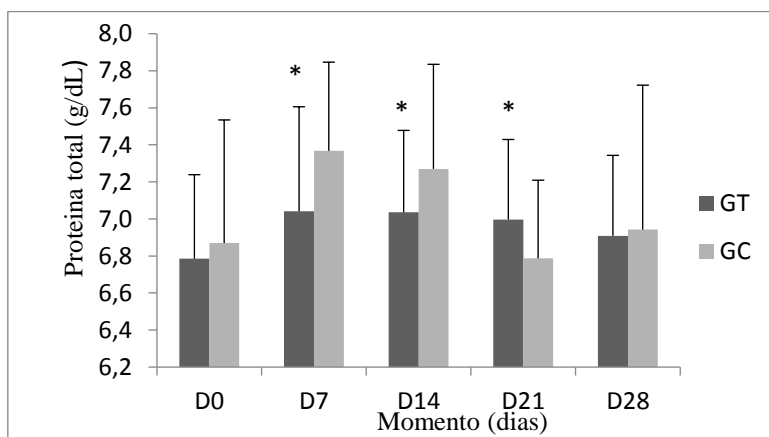


Grafico 24- Medias y desvío estándar de la concentración de proteína total (g/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$).

11.4 ANÁLISIS DE FIBRINÓGENO PLASMÁTICO

No fueron observadas diferencias entre las concentraciones de fibrinógeno plasmático entre los momentos dentro de los grupos ni entre los grupos (GT y GC) ($p > 0,05$) (Grafico 25).

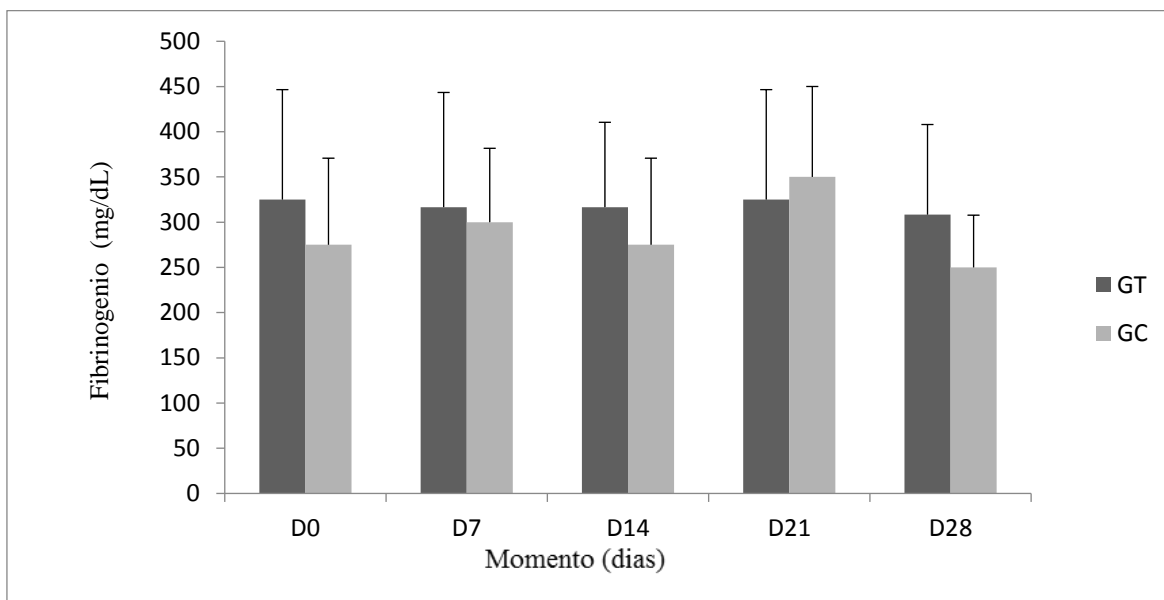


Grafico 25 - Medias y desvío estándar de la concentración de fibrinógeno (mg/dL) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento.

11.5 CUANTIFICACIÓN DE PROSTAGLANDINA E₂ (PGE₂)

No fueron observadas diferencias en la cuantificación de prostaglandina E₂ (PGE₂) entre los momentos dentro de los grupos ($p > 0.05$). Se observó en el GT aumento en relación a el GC en los momentos D0, D7, D14, D21 y D28 ($p < 0.05$) (Grafico 26).

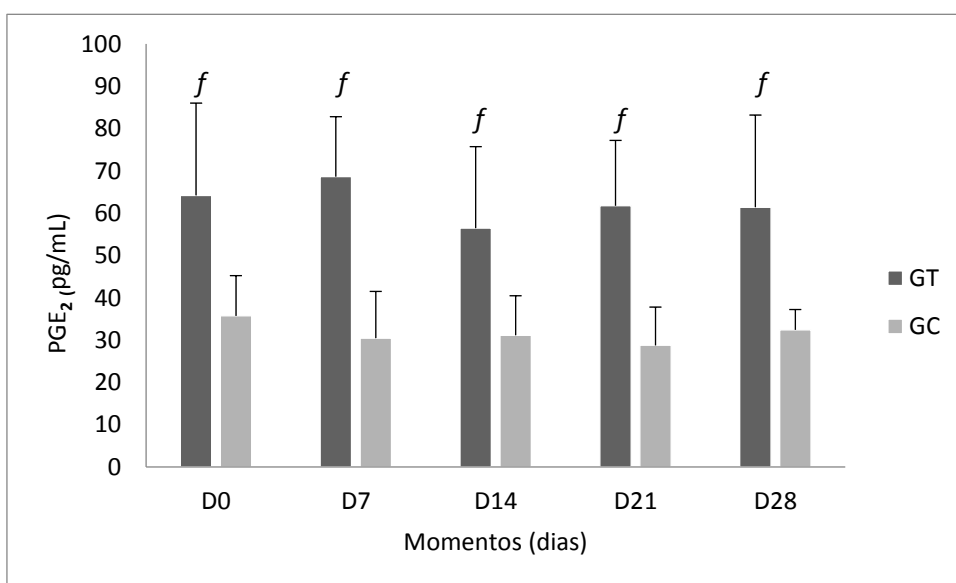


Grafico 26- Medias y desvío estándar en la cuantificación de prostaglandina E2 (PGE2) de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

11.6 EVALUACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Se observó aumento en el índice de activación de neutrófilos (*burst* activado/*burst* basal) en el GC en relación a los valores iniciales en los momentos D11, D21 y D28. ($p < 0,05$). No hubo diferencia entre los momentos del GT ($p > 0,05$). Se observó en el GT aumento en relación a el GC en los momentos D0 y D28. ($p < 0,05$) (Grafico 27).

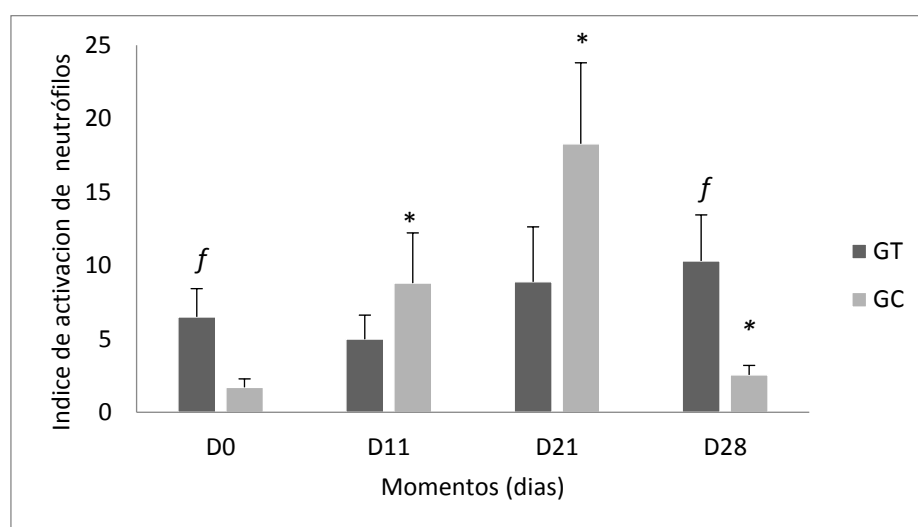


Grafico 27 - Medias y desvío estándar del índice de activación de neutrófilos de los animales del grupo tratado (GT) y grupo control (GC) en los diferentes días del experimento, * Diferencia estadística en relación a los valores iniciales ($p < 0,05$); *f* Diferencia estadística entre GC y GT.

12 DISCUSIÓN

Payr y Aubourg (1936), fueron los primeros en sugerir la insuflación rectal de ozono en el colon y hoy esta via ha sido frecuentemente adoptada en todo el mundo por ser de fácil realización, bajo costo y prácticamente libre de riesgos (Velio Bocci, 2010). La insuflación rectal es potente para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y no infecciosas del sistema digestivo, puesto que ozono actúa destruyendo parásitos gastrointestinales, virus, ritckettsias, bacterias, protozoarios y hongos, siendo también efectivo en la enfermedad inflamatoria intestinal (Leyva, 2011).

Durante la realización de este estudio, en ningún momento del tratamiento los animales demostraron incomodidad o alteración de comportamiento durante la administración de ozono trans-rectal, solo se observó un aumento en el número de defecaciones. Las constantes fisiológicas se mantuvieron dentro de los valores normales a lo largo del tratamiento corroborando con (Haddad et al., 2009), el cual utilizo aplicaciones intravenosas de 500 y 1000 mL de la solución fisiológica con ozono en equinos sanos.

El efecto de ozono en las células rojas, el mejoramiento en las propiedades reológicas de la sangre, más el aumento en la flexibilidad de los eritrocitos, fueron logrados con la aplicación de ozono en auto-hemoterapia (V. A. Bocci, 2007; Gérard, 2001; Menéndez, 2008; Sousa, 2009), en el estudio realizado por (López, 2007) el cual utilizo auto-hemoterapia con ozono en dosis de 500 y 1000 mL, se obtuvo como resultado aumento significativo en las células rojas, semejante a los resultados obtenidos en este trabajo. Estos resultados están de acuerdo con los estudios realizados en humanos, en los cuales los pacientes respondieron al tratamiento con ozono de una forma similar tanto en auto-hemoterapia como a la insuflación rectal (V. A. Bocci, 2007; Gérard, 2001; Menéndez, 2008; Sousa, 2009)

Un aumento gradual a lo largo del tratamiento en el CHCM indica que ozono ayuda a mejorar la oxigenación de los eritrocitos y es un tratamiento que puede ser utilizado

en enfermedades circulatorias, datos semejantes fueron encontrados por (V. A. Bocci, 2007; Re et al., 2008). Estos autores observaron el mejoramiento en las propiedades reológicas de la sangre acompañado por un crecimiento en la flexibilidad de los eritrocitos. En este estudio fue observado un aumento en el número de hematies, en el valor de hematocrito, en la concentración de hemoglobina, y disminución del VCM. Mismo con disminución del VCM lo que hace referencia a un número menor de hematies por espacio, los valores están dentro de los parámetros de referencia para equinos según (Carvalho, Macedo, Teixeira, Binda, & Coelho, 2016). probablemente estos resultados son debido a los efectos de ozono, cuando se mezcla el gas con las membranas de esas células (V Bocci, 1994).

En este estudio los valores de las células blancas no demostraron aumento significativo, lo cual puede ser debido a la dosis y/o vía utilizada, que no fueron eficaces para inducir una respuesta más activa de la medula ósea. (López, 2007; Penido, 2010) afirman que el ozono fortalece el sistema inmunológico, principalmente en dosis de 100mL, estimulando las células blancas y aumentando la actividad de los leucocitos para detectar células patógenas que producen cáncer y demás enfermedades, los resultados sugieren que una dosis más elevada de ozono podría inducir una respuesta más activa de la medula ósea para la liberación de estas células en la circulación sanguínea. Se acredita también que los efectos de los metabolitos de ozono pueden llevar a aumento en la actividad de los linfocitos ayudando en el fortalecimiento de las defensas del organismo (Silva et al., 2009).

Los datos obtenidos en este estudio para el perfil renal (urea y creatinina) están dentro de los de referencia según (Neves et al., 2014), lo cual indica que la insuflación de ozono transrectal en las dosis utilizadas en este trabajo, no afectaron la función renal de los caballos.

En este estudio los valores de las bilirrubinas directa y total presentaron aumento en relación a los valores iniciales, mas continúan dentro de los valores de referencia según (Días, Ch, Li, & G, 2011). Los valores de GGT y AST no sufrieron alteración.

Podemos inferir que la insuflación transrectal de ozono, no interfirió en el perfil hepático. En el estudio de (H. Ajamieh, Merino, & Candelario-jalil, 2002), la AST se mantuvo estable durante la utilización de insuflación rectal de ozono en la isquemia/reperfusión; en el estudio realizado por (Haddad et al., 2009), auto-hemoterapia con ozono, la GGT también se mantuvo dentro de los valores de referencia.

A pesar que los valores de fibrinógeno plasmático permanecieron sin alteraciones durante el periodo experimental, fue observado un aumento en la concentración de proteína total, principalmente en consecuencia del aumento en la concentración de albumina.

En este estudio la PGE2 fue mayor en el grupo tratado desde el momento 0 en comparación al grupo control, posiblemente en consecuencia de la castración realizada en todos los animales antes de comenzar el experimento, cuyo intervalo de tiempo entre la misma y el inicio del experimento fue menor en el grupo tratado. Debido a esta observación, podemos inferir que el ozono no inhibió a síntesis de PGs. La PGE2 es considerada uno de los principales mediadores inflamación y de dolor. En el trato gastrointestinal la PGE2, es sintetizada a partir de COX-1, es responsable por mantener el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica e intestinal, y está asociada a producción de moco, secreción de bicarbonato, inhibición de la secreción gástrica, vasodilatación, regeneración epitelial, división celular y angiogénesis (Halter & Peskar, 2001). Las prostaglandinas también interfieren en la motilidad gastrointestinal, cuyo efecto varía dependiendo de la región intestinal y de la orientación de la musculatura lisa. A pesar de la insuflación transrectal de O₃, alteraciones en la motilidad de los animales no fueron observadas, lo único observado fue aumento en el número de las defecaciones después de la insuflación con ozono, que puede estar ligado a la manipulación.

En el estudio realizado por (Van Hoogmoed, 2002), la PGE2 aumento la fuerza contráctil de la musculatura lisa longitudinal del colon dorsal y ventral, disminuyo la

actividad contráctil de la musculatura lisa circular del colon ventral y aumento de la flexura pélvica y la PGE₂α aumento la contractilidad de la musculatura longitudinal del colon dorsal, ventral y flexura pélvica. Según (Melo, Fiório, Barbosa, Araújo, & Ferreira, 2009) el aumento de la contractibilidad se debe a la elevación de la concentración de calcio citosólico, reducción de la síntesis de AMP cíclico o inducción de la liberación de acetilcolina por el plexo mioenterico. Es por eso que los fármacos que inhiben las PGs causan disturbios en el sistema gastrointestinal, principalmente úlceras gástricas e intestinales.

La citometría de flujo fue utilizada para analizar el comportamiento de los neutrófilos y su mudanza en el índice de activación. Según la ozonoterapia actúa en estas células mejorando su función y haciendo que ellas se activen más fácilmente e con más eficiencia. En este estudio no fue observado aumento o disminución en la inducción de la actividad de neutrófilos, al contrario de lo observado en el grupo control, más susceptible al desafío con PMA. Podemos inferir que O₃ actuó como modulador de estas reacciones.

13 CONCLUSIONES

1. La aplicación transrectal de O₃ no afecta las constantes fisiológicas de los equinos en la vía y dosis utilizadas en este estudio
2. La aplicación transrectal de O₃ puede mejorar indirectamente la oxigenación y el metabolismo de los tejidos, debido al efecto directo en el número de células rojas y cantidad de hemoglobina; y modular producción de EROs.
3. La aplicación transrectal de O₃ no presentó efectos anti-inflamatorios a través de la medición de PGE₂ este modelo experimental.

14 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P., & Lomri, A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine*, 74(4), 324–329. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.02.002>
- Ajamieh, H. H., Berlanga, J., Merino, N., Sánchez, G. M., Carmona, A. M., Cepero, S. M., ... León, O. S. (2005). Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transplant International*, 18(5), 604–612. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2005.00101.x>
- Ajamieh, H., Merino, N., & Candelario-jalil, E. (2002). SIMILAR PROTECTIVE EFFECT OF ISCHAEMIC AND OZONE OXIDATIVE PRECONDITIONINGS IN LIVER ISCHAEMIA / REPERFUSION INJURY. *Pharmacological Research*, 45(4). <https://doi.org/10.1006/phrs.2002.0952>
- Alves, G. E. S., Abreu, J. M. G., Ribeiro Filho, J. D., Muzzi, L. A. L., Oliveira, H. P., Tannus, R. J., & Buchanan, T. (2004). Efeitos do ozonio nas lesões de reperfusão do jejuno em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 56(4), 433–437.
- Ballardini, E. (2005). Oxygen-Ozone Therapy for Spinal Muscle. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 4, 70–73.
- Ballardini, E. (2006). Changes in Haemochromocytometric Values in Horses after Ozone Auto-haemotransfusion. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5, 47–52.
- Bocci, V. (1994). A reasonable approach for the treatment of HIV infection in the early phase of ozonotherapy (autohaemotherapy). How “inflammatory” cytokines may have a therapeutic role. *Mediators Inflamm*, 3(5), 315–321. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=>

L24318712

Bocci, V. (2010). *OZONE A NEW MEDICAL DRUG*.

Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, 5(2), 93–104.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>

Bocci, V. A. (2007). Tropospheric Ozone Toxicity vs. Usefulness of Ozone Therapy. *Archives of Medical Research*, 38(2), 265–267.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2006.09.011>

Campo, G. M., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A., Altavilla, D., Micali, C., & Calatroni, A. (2003). Aromatic trap analysis of free radicals production in experimental collagen-induced arthritis in the rat: protective effect of glycosaminoglycans treatment. *Free Radical Research*, 37(3), 257–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12688421>

Carvalho, R. S. de, Macedo, L. P., Teixeira, F. A., Binda, M. B., & Coelho, C. S. (2016). Volume Corpuscular Médio (Vcm) E Amplitude Da Distribuição Do Tamanho Dos Eritrócitos (Rdw) Em Equinos Da Raça Quarto De Milha Usados Em Provas De Três Tambores. *Ciência Animal Brasileira*, 17(3), 411–417.
<https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i335842>

Días, H. G., Ch, C. G., Li, O., & G, A. (2011). VALORES HEMATOLÓGICOS, BILIRRUBINEMIA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SÉRICA EN CABALLOS PERUANOS DE PASO DEL VALLE DE LURÍN, LIMA. *Revista de Investgaciones Veterinarias Del Perú (RIVEP)*., 22(3), 213–222.

Garcia Liñeiro, J. A., Teresa, A., Hugo, S., & Eugenia, D. (2009). Eco guide oxygen peroxidum injection (ozone therapy) as treatment of intervertebral lesions in horses. Description of the evolution of 15 cases. *International Congress of the*

World Equine Veterinary Association, (September 2009).

Gérard, V. S. (2001). A Virology Primer: With Special Reference to Ozone. Retrieved May 30, 2016, from <http://www.triroc.com/sunnen/topics/virology.htm>

Gracer, R. I., & Bocci, V. (2005). Can the combination of localized “proliferative therapy” with “minor ozonated autohemotherapy” restore the natural healing process? *Medical Hypotheses*, 65(4), 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.04.021>

Haddad, M. A., Souza, M. V., Hincapie, J. J., Ribeiro, J. I., Ribeiro Filho, J. D., & Benjamin, L. A. (2009). Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em equinos submetidos à ozonioterapia. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 61(3), 539–546.

Halter, F., & Peskar, B. M. (2001). Cyclooxygenase 2 — implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives. *Www.gutjnl.com*, 49, 443–453.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>

Higgins, A. J., Lees, P., Taylor, J. B. O., & Ewins, C. P. (1986). Flunixin meglumine: Quantitative determination in and effects on composition of equine inflammatory exudate. *British Veterinary Journal*, 142(2), 163–169. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90093-X](https://doi.org/10.1016/0007-1935(86)90093-X)

Jani, P., Patel, G., Yadav, P., Sant, L., & Jain, H. (2012). Ozone therapy: the alternative medicine of future. *Indian Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2(4), 196–203.

- Keck, G. (1992). Toxicite et effets indesirables des anti-inflammatoires non-steroidiens. *Rec Méd Vét*, 168, 615–620. Retrieved from <http://www.sudoc.abes.fr/DB=2.1/SRCH?IKT=12&TRM=043492347>
- Ketterer, B. (1970). Amino-Azo-Dye-Binding Protein in the Soluble Cytoplasm of the Rat Liver. *Biochemical Society*, 53–54.
- Kirschvink, N., Moffarts, B. de, & Lekeux, P. (2008). The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *Veterinary Journal*, 177(2), 178–191. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.033>
- Lees, P., Sedgwick, A. D., Higgins, A. J., Pugh, K. E., & Busch, U. (1991). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of miloxicam in the horse. *British Veterinary Journal*, 147(2), 97–108. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(91\)90099-9](https://doi.org/10.1016/0007-1935(91)90099-9)
- Leyva, A. F. R. (2011). *Utilidad clínica de la ozonización de la sangre y sus componentes en equinos*. Universidad de Buenos Aires.
- López, L. G. (2007). *Efecto de la Ozonoterapia sobre los parámetros hematológicos y constantes fisiológicas en equinos*. Zamorano.
- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Veterinary Journal*, 173(3), 502–511. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.06.005>
- Mawsouf, M. N., El-sawalhi, M. M., Darwish, H. A., & Shaheen, A. A. (2011). Effect of ozone therapy on redox status in experimentally induced arthritis. *Revista Española de Ozonioterapia*, 1(1), 32–43.
- May, S. A., Hooke, R. E., & Lees, P. (1992). Species restrictions demonstrated by the stimulation of equine cells with recombinant human interleukin-1. *Veterinary*

Immunology and Immunopathology, 30(4), 373–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1546442>

Melo, U. P. De, Fiório, R. C., Barbosa, T., Araújo, S., & Ferreira, C. (2009). Intoxicação por fenilbutazona em equino: relato de caso. *Acta Veterinaria Brasilica*, 3(2), 111–116.

Menéndez, cepero S. (2008). *El Ozono: Aspectos Básicos y sus Aplicaciones*. ResearchGate (Editorial). Ciudad de La Habana: ResearchGate.

Murray, M., & Brater, D. (1993). Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 33, 435–465.

Neves, M., Benesi, F. J., Noronha, T., Coelho, C. S., Souza, P. M. De, Mieko, R., ... Fernandes, W. R. (2014). Função renal em eqüinos sadios , da raça Mangalarga Paulista , criados no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Ciencia Veterinária*, 12(1), 106–109.

Ogata, a, & Nagahata, H. (2000). Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 62(7), 681–686. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.681>

Penido, B. R. . C. de A. L. L. F. L. F. (2010). Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. *PUBVET, Publicações Em Medicina Veterinária E Zootecnia. Aplicações*, 4(40).

Re, L., Mawsouf, M. N., Menéndez, S., León, O. S., Sánchez, G. M., & Hernández, F. (2008). Ozone Therapy: Clinical and Basic Evidence of Its Therapeutic Potential. *Archives of Medical Research*, 39(1), 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.07.005>

- Re, L., Sánchez, G. M., & Mawsouf, N. (2010). Clinical evidence of ozone interaction with pain mediators. *Saudi Medical Journal*, 31(12), 1363–1367.
- Schwartz, A. F., & Sánchez, G. M. (2012). Factores de crecimiento derivados de plaquetas y sus aplicaciones en medicina regenerativa. Potencialidades del uso del ozono como activador. *Revista Española de Ozonoterapia*, 1(1), 54–73. Retrieved from <http://revistaespaoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/7>
- Schwartz, A., & Sánchez, G. (2012). Ozone Therapy and Its Scientific Foundations. *Revista Española de Ozonoterapia*, 2(1), 199–232. Retrieved from <http://www.revistaespaoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/27>
- Silva, R. A., Eduardo, J., Garotti, R., Santos, R., Silva, B., & Iii, A. N. (2009). Análise do efeito bactericida do pneumoperitônio de ozônio. *Acta Cirurgica Brasileira*, 24(2), 124–127.
- Sorg, O. (2004). Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327(7), 649–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15344815>
- Sousa, B. I. O. B. D. E. (2009). *Auto-Hemoterapia Como Terapia Auxiliar No Tumor Venéreo Transmissível*. Universidad Católica de Brasília.
- Sweeney, R. W., Sweeney, C. R., & Weiher, J. (1991). Clinical use of metronidazole in horses: 200 cases (1984-1989). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(6), 1045–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032913>
- Van Hoogmoed, L. M. (2002). In vitro investigation of the effect of prostaglandins and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on contractile activity of the equine smooth muscle of the dorsal colon, ventral colon, and pelvic flexure. *American Journal of*

Veterinary Research, 63(11), 1496–1500.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.1496>

Zobel, R., Tkalčić, S., Štoković, I., Pipal, I., & Buić, V. (2012). Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 293–298. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01857.x>

15. ANEXOS

15.1 certificado comissão de bioética

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA	
Comissão de Ética no Uso de Animais	
CERTIFICADO	
<p>Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito anti-inflamatório do ozônio medicinal trans-retal em cavalos", protocolada sob o CEUA nº 6720220516, sob a responsabilidade de Raquel Yvone Arantes Baccarin - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.</p> <p>We certify that the proposal "Evaluation of the anti-inflammatory effect of the trans - rectal medical ozone in horses", utilizing 12 Equines (12 males), protocol number CEUA 6720220516, under the responsibility of Raquel Yvone Arantes Baccarin - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.</p>	
Finalidade da Proposta: Pesquisa	
Vigência da Proposta: de 07/2016 a 06/2017	Área: Clínica Médica Veterinária
Origem: Animais provenientes de doação espontânea	
Espécie: Equídeos	sexo: Machos idade: 2 a 3 anos N: 12
Linhagem: Puro Sangue Árabe	Peso: 260 a 350 kg
<p>Resumo: A ozonioterapia envolve a aplicação de ozônio medicinal (O3) com objetivo terapêutico, ou seja, uma mistura de ozônio e oxigênio que reagirá com moléculas diferentes no corpo, tais como lipídios e proteínas. As espécies reativas de oxigênio e produtos de lipoperoxidação produzidos pelo contato com o ozônio exercerão uma série de efeitos no organismo como, melhora da oxigenação e metabolismo dos tecidos, angiogênese, aumento dos mecanismos antioxidantes, melhora do sistema imune, efeito anti-inflamatório e modulação dos mediadores químicos da dor. A ozonioterapia já é bastante difundida e estudada na medicina humana, mas nos últimos anos tem sido utilizada em estudos na medicina veterinária, demonstrando seu efeito terapêutico em várias afecções. Porém, estudos expressivos que comprovem sua segurança e eficácia em equinos são escassos. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito anti-inflamatório do ozono medicinal via trans-retal.</p>	
Local do experimento: HOVET/USP	
São Paulo, 13 de abril de 2017	
 Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais	 Roseli da Costa Gomes Secretária Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

